



Interactions réciproques de la protéine de l'autophagie GABARAP et de membranes modèles.

Isabelle Motta

► To cite this version:

Isabelle Motta. Interactions réciproques de la protéine de l'autophagie GABARAP et de membranes modèles.. Physique [physics]. Ecole Normale Supérieure, 2015. Français. NNT : . tel-01256156

HAL Id: tel-01256156

<https://theses.hal.science/tel-01256156>

Submitted on 15 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE

THÈSE DE DOCTORAT EN PHYSIQUE

Interactions réciproques de la
protéine de l'autophagie GABARAP
et de membranes modèles

Auteur :

Isabelle MOTTA

Laboratoire de physique statistique

Département de physique

Thèse soutenue le 4 juin 2015

Directeur de thèse

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Frédéric PINCET

Damien BAIGL

Annie VIALLAT

Aurélien ROUX

Sylvie HÉNON

Thomas MELIA

James ROTHMAN

Entre la conception d'un projet et sa réalisation, il y a un "gap" qui s'appelle la réalité.

Isabelle Motta

Abstract

La macro-autophagie est un processus de dégradation intracellulaire qui implique la formation d'une vésicule à double membranes, l'autophagosome, permettant la séquestration des molécules à dégrader. La formation de l'autophagosome débute par la nucléation de membranes isolées dans le cytosol. Elle se poursuit par une phase de croissance de la membrane en forme de coupe. Dans l'étape finale, l'autophagosome se referme en fusionnant par ses bords pour former la vésicule. La morphologie de l'autophagosome évolue donc durant sa formation. Certaines études montrent que cela est dû à l'implication de machineries protéiques. Indépendamment, d'autres recherches mettent en avant les rôles joués par les propriétés physiques de la membrane.

Dans mon travail de thèse, j'ai cherché à montrer un couplage entre l'activité d'une protéine impliquée dans l'autophagie et les caractéristiques physiques de la membrane. Cette protéine, nommée GABARAP, est considérée comme le marqueur de l'autophagosome car elle est la seule protéine, avec ses homologues, à s'ancrer spécifiquement sur sa membrane lors de sa formation. En incorporant GABARAP dans des vésicules géantes unilamellaires micromanipulées, j'ai pu montrer une influence de la composition et de la courbure de la membrane sur la distribution, l'oligomérisation et la dynamique de la protéine. Ensuite, j'ai mesuré une diminution du module de courbure de la membrane lorsque la protéine y était ancrée. Cette dernière étude m'a amenée à développer un modèle permettant de prédire la distribution de la protéine sur une membrane possédant deux régions de courbures différentes. Enfin, j'ai déterminé la nature de l'interaction en trans de GABARAP.

Abstract

Macro-autophagy is an intracellular degradation process that involves a double membrane vesicle, the autophagosome, to engulf a cargo. Its formation starts with the nucleation of isolated membrane in the cytosol. Then the membrane grows as a cup-shape around the cargo to finally fuse at its edge and enclose the molecules to be degraded. Thus, the autophagosome morphology evolves during its formation. Studies show that protein machineries support such shape changes. Independently, other researches point membrane physical properties roles during its rearrangement.

During my PhD, I investigated the coupling between the activity of one autophagy protein and membranes physical characteristics. This protein, GABARAP, is considered as the autophagosome marker, because, with its homologs, it is the only protein to be specifically anchored to its membrane during all its formation. The reconstitution of GABARAP in micromanipulated giant unilamellar vesicles (GUVs) allowed me to study the interplay between membrane characteristics and protein behaviours. In a first part, I showed that membrane composition and curvature trigger specific distribution, oligomerization and dynamic of GABARAP. Then I measured a decrease of the membrane bending modulus when the protein was anchored. This last result led me to propose a model that predicts proteins distribution on membranes with two regions of different curvatures. Finally, I determined the nature of GABARAP / GABARAP trans interaction.

Remerciements

Au cours de ma thèse, mon entourage m'a soutenue et m'a permis d'accomplir mon travail de recherche, souvent difficile, tout en gardant le sourire. Ces quelques lignes de remerciements ne seront pas suffisantes pour refléter toute l'importance que leur accompagnement quotidien a représenté pour moi. J'essaierai cependant de retranscrire le plus justement possible les qualités de chacun qui, jusque dans les plus petits détails de mon quotidien, se sont révélées des éléments indispensables à la réussite de mon projet.

Une thèse ne se fait pas sans un lieu, je remercie donc les directeurs du laboratoire de physique statistique Eric Perez et Jorge Kurchan qui ont permis l'accomplissement de mon travail de recherche au sein de leur laboratoire.

J'ai eu l'honneur d'être encadrée par Frédéric Pincet qui m'a proposé un sujet à l'interface entre la physique et la biologie en collaboration avec le laboratoire de biologie de Thomas Melia à Yale. Fred a toujours été à l'écoute de mes difficultés scientifiques et je le remercie d'avoir répondu patiemment à toutes mes interrogations. Grâce à lui, j'ai eu l'opportunité de prendre librement mon projet en main, l'explorer et parfois m'y perdre. Heureusement, de nos discussions ressortaient toujours de nouvelles idées qui m'ont aidée à poursuivre mes recherches et à les aborder sous un angle différent. Je le remercie aussi pour ses qualités humaines, sans lesquelles je n'aurais pas pu m'épanouir dans mon projet. Enfin, je ne peux pas m'empêcher de le remercier ici, malgré le caractère officiel de ce document, pour sa compréhension à l'égard de mon rythme de travail ralenti après le déjeuner et qui m'obligeait souvent à prendre un repos au laboratoire avant de rebondir sur de nouvelles manipulations.

Mes recherches ont débuté dans le laboratoire de Thomas Melia à Yale. Tom m'a enseigné toutes les bases de la biologie moléculaire, son ouverture d'esprit m'a permis de poser toutes mes questions sans gêne. Je lui en suis donc très reconnaissante. Grâce à lui, j'ai pu donner à mon projet de recherche un véritable sens biologique. Son dynamisme communicatif m'a toujours poussée à regarder plus loin et à me poser de nouvelles questions.

Fred et Tom m'ont donné l'opportunité d'accomplir un projet de recherche interdisciplinaire sur deux laboratoires, l'un de physique situé à Paris, l'autre de

biologie situé à Yale. Les rencontres et les discussions menées dans ces deux laboratoires m'ont appris à lier des concepts physiques à des systèmes biologiques. Ces voyages entre Paris et Yale ont donc été une expérience unique d'un point de vue scientifique et aussi humain. Pour tout cela, je leur renouvelle mes remerciements.

Je remercie mes rapporteurs Annie Viallat et Aurélien Roux qui ont accepté de lire ma thèse. Ils m'ont chacun apporté un regard extérieur et critique très intéressant. Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury Damien Baigl, Sylvie Hénou, Thomas Melia et James Rothman d'avoir nourri par leurs réflexions et leurs connaissances ma soutenance.

Les membres de mon équipe au LPS et à Yale ont constitué un environnement riche scientifiquement et humainement : Christine Gourier, Wladimir Urbach, Eric Perez, Rachid Thiam, Bertrand Ducos, Kevin Howan, Jérôme Delacotte, Jim Wang, Andrea Gohlke, Shanta Nag, Weiming Xu, Ksenia Astafyeva, Vladimir Adrien, Myriam Chalbi, Claire François-Martin, Benjamin Ravaux, Karlina Kauffman, Clémence Gruget, Hélène Gardavot, Dalila Ajjaji et Kalthoum Ben M'Barek. J'ai apprécié leurs conversations au cours des déjeuners et des pauses, ils ont été une source d'inspiration et des guides. Pour cela je leur exprime toute ma gratitude.

Les personnels de l'administration Marie Gefflot, Nora Sadaoui et Annie Ribaudreau m'ont toujours accompagné dans toutes mes démarches administratives et ont facilité mes départs précipités pour les Etats-Unis, je les en remercie vivement. Je n'oublierai pas leurs conversations chaleureuses qui animaient agréablement des journées de manip souvent difficiles. Je remercie l'équipe informatique, en particulier Zaire Dissi, et Jose Quintas et Carlos Goncalves-Domingues de l'atelier de mécanique qui ont été un soutien indispensable dans la réussite de ma thèse.

J'ai eu le plaisir d'enseigner pendant ma thèse. Les deux premières années, j'ai encadré des projets expérimentaux à l'ENS, je remercie donc Stéphane Fauve de m'avoir transmis les connaissances physiques relatives aux projets. Durant la dernière année, j'ai été conférencière au Palais de la Découverte. J'ai présenté les exposés d'électrostatique, électromagnétisme et chaleur. Kamil Fadel, Hassan Khilfi, Alain De Botton, Sigfrido Zayas, Julien Babel, Emmanuel Sidot, Jacques Petitpré, Atossa Jaubert, Marielle Vergés, Alain Bioget, Hervé Boisson et Guillaume Trap ont pris le temps de m'expliquer ces exposés et m'ont aidée à appréhender

un large public. Grâce à eux, j'ai passé des weekends inoubliables au Palais de la Découverte et je les remercie.

Je remercie tout particulièrement trois personnes qui ont marqué mes années de thèse scientifiquement et personnellement, Claire François-Martin, Benjamin Ravaux et Kevin Howan. Ils ont été d'un grand soutien lors de mes recherches, toujours prêts à m'écouter et m'aider lorsque j'étais en difficulté. J'ai apprécié particulièrement le rôle de biologiste que Kevin a assumé dans une équipe de physiciens avec beaucoup de patience. Il m'a souvent aidée à comprendre des aspects biologiques de mon sujet et m'a guidée dans la réalisation d'expériences difficiles. Benjamin, Claire et Kevin ont été bien plus que d'excellents collègues, ils ont aussi été des amis avec qui j'ai bu un nombre incalculable de verres de vin, de cocktails, de chocolats, de thés et de shots. Nous avons partagé un même intérêt pour le théâtre, les expositions et le cinéma, j'ai aimé les discussions qui suivaient et représentaient pour moi une véritable coupure si essentielle au bon déroulement de mes recherches.

Ma deuxième année de thèse a été marquée par un projet personnel d'ampleur. Claire, Benjamin et moi-même avons réalisé un court métrage de médiation scientifique, "Rencontre Fusionnelle", expliquant le sujet de thèse de Benjamin. Nous avons vécu cette aventure tous les trois : l'écriture du scénario, le tournage, le montage et enfin la projection lors du festival "les chercheurs font leur cinéma".



Cette expérience demeure un de mes plus beaux souvenirs de thèse.

Mes directeurs de master 2 Interface Physique-Biologie, Mathilde Badoual et Julien Heuvingh ainsi que mes amis de promotion Camille Paoletti, Charlotte Guetta, Clotilde Le Quiniou, Pauline Durand, Aurélien Peilloux, Hugo Wioland, Jordan Monnet, Léo Valon, Maxime Ardré, Maxime Dureau m'ont aidée à trouver ma voie dans la recherche en partageant leur connaissance, leurs expériences personnelles et leur bonne humeur. Je les remercie chaleureusement et en particulier Pauline qui m'a orientée vers le laboratoire de Frédéric Pincet.

Assina Assam, Margaux Renaudat Saint-Jean et Adeline Nogré, des amies bien que néophytes dans mon sujet de recherche, ont écouté pendant quatre années mes difficultés à l'occasion de soirées mojitos ou d'après-midi chocolats chauds. Je leur en suis très reconnaissante car elles me rassuraient en m'apportant leurs regards extérieurs et me faisaient même rire dans les moments difficiles. Bien sûr, je remercie chaleureusement tous mes amis Elizabeth Oliver, Géraldine Brichant, Romain Roncin, Benjamin Racine, Alexandra Damasse, Kristel Ndjountche, Marie Herbaut, Matthieu Baillergeau, Jorge Prego, Shivram Subramanian, Irina et Florian Meyer. Leur soutien a pris différentes formes : discussions tranquilles, repas animés, grosses soirées, sorties culturelles. Chacun à leur manière, ils ont apporté un petit quelque chose à mon quotidien qui me rendait heureuse et me permettait d'aborder mes recherches sereinement.

Mes parents Anne et Hugues Motta, mon frère Christophe Motta ainsi que toute ma famille ont été présents pendant mes années de thèse et d'études qui ont précédées. Il ont toujours été à mes côtés et grâce à eux avant de finir ma thèse j'ai pu la commencer.



Table des matières

Abstract	iv
Remerciements	vi
Table des matières	xi
Abréviations	xv
Constantes physiques	xvii
Symboles	xix
 Introduction	 1
 1 Les membranes	 7
1.1 Les membranes biologiques	7
1.2 Les lipides dans la membrane	10
1.2.1 Phospholipides et stérols	10
1.2.2 La membrane : un fluide à deux dimensions	13
1.2.3 Les domaines lipidiques dans les membranes	14
1.2.4 Défauts à la surface de la membrane découvrant la partie hydrophobe de la bicouche	17
1.3 Les protéines	18
1.3.1 La structure des protéines	18
1.3.2 Les protéines membranaires et exemple de l'hélice amphiphile	19
1.4 Les membranes modèles	21
1.4.1 Intérêt des modèles membranaires	21
1.4.2 La micromanipulation de GUVs	23
1.5 Propriétés physiques des membranes étudiées sur des GUV	25
1.5.1 Tension de membrane calculée pour une GUV et tension de lyse	25
1.5.2 Osmolarité d'une solution et perméabilité des membranes . .	26
1.5.3 Surface et volume constants des GUVs	28
1.5.4 Energie de courbure de la membrane	29

1.5.5	Module de courbure de la membrane calculé pour une GUV	30
2	L'autophagie	35
2.1	Le rôle de l'autophagie dans la cellule	35
2.1.1	Principe de l'autophagie	35
2.1.2	Fonctions et dysfonctions de l'autophagie	36
2.2	L'autophagosome	39
2.2.1	Formation de l'autophagosome	39
2.2.2	Origine et composition de l'autophagosome	40
2.2.3	Morphologie de l'autophagosome lors de sa formation	42
2.3	Les protéines impliquées dans l'autophagie	49
2.3.1	La famille de protéines Atg permet la formation de l'autophagosome	49
2.3.2	Les protéines Atg8/LC3 marqueurs de l'autophagosome	51
2.3.3	Structure des protéines Atg8/LC3	53
2.3.4	Lipidation de la protéine Atg8/LC3 sur la membrane	53
2.3.5	Ancrage d'Atg3 dans la membrane	56
3	Incorporation de GL1 dans des modèles membranaires	61
3.1	Choix des modèles membranaires servant de substrat à la protéine GL1	61
3.2	Les deux stratégies de lipidation de la protéine GL1 sur des liposomes	64
3.3	Incorporation de GL1 dans des petits liposomes	65
3.3.1	Les réactions de lipidation	65
3.3.2	Courte étude sur des GL1-PE liposomes	68
3.4	Aperçu des rôles GL1 connus à ce jour	70
4	La méthode du choc osmotique	77
4.1	Difficultés d'adaptation des GUVs aux réactions de lipidation appliquées sur des petits liposomes.	77
4.1.1	Les caractéristiques membranaires des GUVs limitent l'incorporation de GL1	78
4.1.2	Faible concentration lipidique d'une solution de GUV	80
4.2	Formation de GUVs avec la méthode du choc osmotique	81
4.3	Calcul de la tension de lyse	82
4.4	Paramètres variables de la méthode du choc osmotique	84
4.4.1	Concentration en sel de la solution de liposomes initiale	84
4.4.2	Composition saline de la solution de liposomes initiale	85
4.4.3	Concentration en lipides de la solution de liposomes initiale	85
4.5	Formation de protéo-GUVs avec la méthode du choc osmotique	88
4.5.1	La méthode du choc osmotique pour la formation de protéo-GUVs	88
4.5.2	Quantification de la protéine GL1 incorporée dans la membrane des GUVs	89
4.5.3	Fonctionnalité de GL1 ancré sur les GUVs	90

4.6	Unilamellarité des vésicules formées par la méthode du choc osmotique	93
5	Répartition et oligomérisation de GL1 sur des bicouches plates de différentes compositions	99
5.1	Répartition de GL1 en fonction de la chaîne lipidique d'ancrage	100
5.1.1	Intérêt biologique et exemple des vacuoles chez <i>saccharomyces cerevisiae</i>	100
5.1.2	Compositions lipidiques des GUVs	102
5.1.3	Lipidation sur des petits liposomes	104
5.1.4	Répartition de GL1 sur les GUVs	104
5.2	Diffusion de GL1-PE sur la membrane	106
5.2.1	Le coefficient de diffusion : un indicateur de l'état d'oligomérisation	107
5.2.2	Mesure du coefficient de diffusion par la méthode du FRAP	110
5.2.3	Résultat et analyse	110
5.3	GL1 est monomérique ou faiblement oligomérisé sur la membrane	114
5.3.1	Technique photoblanchiment par palier	114
5.3.2	Mesures et analyses	115
6	Association homotypique de GL1 en trans et absence de fusion membranaire	121
6.1	Dispositif expérimental	122
6.2	Quantification de l'association en trans de deux protéines GL1	123
6.2.1	Enrichissement de GL1 dans la zone de contact	123
6.2.2	Analyse du patch de protéines GL1 ^{G116} -PE	128
6.3	Absence de fusion membranaire	128
7	Effet du module de courbure et de la courbure de la membrane sur la répartition de GL1	135
7.1	Analyse de l'origine des tubes tirés dans le cadre de l'expérience sur les interactions en trans de GL1	136
7.2	Extraction d'un tube de membrane d'une GUV et mesure de son rayon	136
7.3	Mesure du module de courbure d'une membrane avec et sans GL1 ^{G116} ancré	138
7.4	Recrutement de GL1 dans les zones les plus courbées de la membrane	140
7.5	Prédiction du recrutement de la protéine selon la différence de courbure entre deux régions de la membrane	143
	Conclusion	149
A	Small liposomes preparation	153
B	Dye preparation and protein GL1^{G116} labelling	157

C Lipidation reaction of GL1 ^{G116}	159
D Lipidation reaction of GL1 ^{G116} C	161
E Osmotic shock method	163
F Fluorescent signal measurement	165
G RavZ cleavage	167
H Micropipette preparation	169
I Fluorescence recovering after photobleaching (FRAP)	171
J Step bleaching experiment	173
K Tube extraction	175
L Electroformation	179
M Supported bilayers fabrication	181
N Quantification of the protein GL1 ^{G116} on GUVs membranes	183
 Bibliographie	 185
Article "Formation of giant unilamellar proteo-liposomes by osmotic shock", Motta et al. 2015	196

Abréviations

ADN	A cide D ésoxyribo N ucléique
ATG ou Atg	AuT opha Gy
CMA	C haperone M ediated A utophagy
DLS	D iffusion L ight S cattering
DMPC	1,2- DiM yristoyl-sn-glycero-3- P hos phoC holine
DMPE	1,2- DiM yristoyl-sn-glycero-3- P hos phoE thanolamine
DOG	1,2- DiO leoyl-sn-glycero-3- G lycerol
DOPC	1,2- DiO leoyl-sn-glycero-3- P hos phoC holine
DOPE	1,2- DiO leoyl-sn-glycero-3- P hos phoE thanolamine
DOPS	1,2- DiO leoyl-sn-glycero-3- P hos pho-L-S erine
DPPC	1,2- DiP almitoyl-sn-glycero-3- P hos phoC holine
DPPE	1,2- DiP almitoyl-sn-glycero-3- P hos phoE thanolamine
ER	R eticulum E ndoplasmique
FRAP	F luorescence R ecovery A fter P hotobleaching
GABARAP	G amma- A mino B utyric A cid R eceptor A ssociated P rotein
GL1	G ABR A PL 1
GUV	G iant U nilamellar V esicle
ITO	I ndium T in O xide
l_d ou L_α	liquide d ésordonné
l_o	liquide ordonné
LUV	L arge U nilamellar V esicle
NBD	N itro B enzoxa D iazole
PA	P h A gophore
PDMS	P oly D i M éthyl S iloxane

PE	P hosphatidyl E thanolamine
PI	P hosphatidyl I nositol
PI(3)P	P hosphatidyl I nositol-3- P hosphate
POPC	1- P almitoyl-2- O leoyl-sn-glycero-3- P hospho C holine
SDS	Sodium D odecyl S ulfate
SNARE	Soluble N -éthylmaleimide-sensitive-factor A ttachment protein R Eceptor
S_o	p hase g el
SUV	Small U nilamellar V esicle
TCEP	T ris(2- C arboxy E thyl) P hosphine
YFP	Y ellow F luorescent P rotein

Constantes physiques

Accélération de la pesanteur	g	$=$	9.8 m.s^{-2}
Constante de Boltzmann	k_B	$=$	$1.38 \times 10^{-23} \text{ m}^2.\text{kg.s}^{-2}.\text{K}^{-1}$
Constante des gaz parfaits	R	$=$	8.314 U.I.
Masse volumique de l'eau	ρ_{eau}	$=$	1000 kg.m^{-3}
Osmolarité physiologique	Osm	$=$	$280 - 300 \text{ mOsm}$
Température ambiante	T	$=$	300 K

Symboles

C_0	Courbure spontanée de la membrane	μm^{-1}
C_1 et C_2	Courbures principales de la membrane	μm^{-1}
d	Diamètre du disque de membrane photoblanchi	μm
D	Coefficient de diffusion	$\mu m^2.s$
F	Force nécessaire à l'extraction d'un tube de membrane	N
I	Intensité de fluorescence	$U.A.$
k	Module de courbure de la membrane	J
L_l	Longueur de la membrane à l'intérieur de la micropipette	μm
L_t	Longueur du tube de membrane extrait	μm
P	Pression à l'extérieur de la GUV	Pa
$P_{aspiration}$	Pression d'aspiration	Pa
P_{GUV}	Pression à l'intérieur de la GUV	Pa
P_{osm}	Pression osmotique	Pa
P_p	Pression à l'intérieur de la micropipette	Pa
R_{GUV} et R_v	Rayon de la GUV	μm
R_p et R_l	Rayon interne de la micropipette	μm
R_t	Rayon du tube de membrane extrait	μm ou nm
T	Température	$^{\circ}C$ ou K
T_M	Température de fusion des lipides (Melting temperature)	$^{\circ}C$
τ	Tension de la membrane	$mN.m^{-1}$

Les aquarelles présentées en début de chapitre ont été peintes par moi-même. Dans chacune, j'ai représenté une vision personnelle du contenu du chapitre qui la suit.

Introduction

La cellule est l'unité de base du vivant, elle a la capacité de s'auto entretenir tout en interagissant avec son environnement. Sa membrane plasmique permet de délimiter son milieu interne de son milieu externe. Le milieu intracellulaire est composé en partie d'organelles assurant le fonctionnement de la cellule. Ces organelles sont des structures elles-mêmes délimitées par une membrane. La cellule tout comme les organelles qu'elle contient sont capables de réagir à des signaux extérieurs et de s'adapter à l'environnement. Ces interactions donnent souvent lieu à des réorganisations de leur membrane qui reposent sur un complexe réseau de machineries protéiques et sur les propriétés mécaniques des membranes.

Lorsqu'une cellule se trouve en manque de nutriments, elle recycle une partie de son cytosol, au travers d'un mécanisme nommé l'autophagie, afin de produire sa propre énergie. Ce processus implique la formation d'une vésicule à double membrane appelée autophagosome. Ce dernier est issu de la nucléation de membranes isolées dans le cytosol suivie d'une phase d'expansion de la membrane autour des molécules à dégrader. A ce stade intermédiaire l'autophagosome adopte une forme de coupe. Dans l'étape finale, l'autophagosome se ferme par fusion de ses bords sur la molécule à dégrader. La morphologie de l'autophagosome évolue donc au cours du processus. Des études montrent l'implication de machineries protéiques dans la formation de l'autophagosome, toutefois la fonction exacte des protéines sur la membrane est quasiment inconnue à ce jour.

L'autophagie nécessite l'intervention de plus de 30 protéines. Une partie d'entre elles intervient dans la formation de l'autophagosome et se lie à sa membrane, mais seulement une protéine est liée de façon spécifique et permanente à la membrane de l'autophagosome. Cette protéine se nomme Atg8 chez les levures et GABARAP ou LC3 chez les mammifères, elle se lie covalamment aux lipides composants la membrane de l'autophagosome et y reste ancrée durant toute sa formation. Elle

est donc considérée comme le marqueur de l'autophagosome. Nous savons par des études antérieures que la protéine GABARAP participe à la formation de l'organelle de l'autophagie cependant nous ne connaissons pas son rôle exact et très peu de choses sont connues sur les interactions réciproques entre la protéine GABARAP et la membrane de l'autophagosome.

Dans mon travail de thèse, j'ai cherché à montrer une régulation de l'activité de la protéine par la membrane et une modification des propriétés mécaniques de la membrane due à l'ancrage de la protéine. Ces études m'ont conduite à utiliser des modèles membranaires et plus spécifiquement des vésicules unilamellaires géantes (GUVs) micromanipulées. Elles me permettaient de contrôler avec précision les propriétés de la membrane, telles que sa composition, sa courbure et sa tension, tout en étudiant le comportement de la protéine GABARAP ancrée. Le choix d'un tel système d'étude était nécessaire, car jusqu'à aujourd'hui le principal modèle d'étude était le petit liposome qui ne permettait pas d'étudier certaines caractéristiques de la protéine comme sa dynamique.

Ce mémoire est divisé en sept chapitres, les deux premiers chapitres étant des chapitres d'introduction et les suivants des chapitres de résultats sur les interactions entre les membranes et les protéines GABARAP.

Le chapitre 1 sera consacré à une description générale des membranes. Dans un premier temps, je présenterai les membranes biologiques et leurs deux principaux composants : les lipides et les protéines. Puis, je décrirai les membranes modèles, qui constituent un système simplifié des membranes biologiques, idéales pour l'étude des interactions membranes protéines. J'achèverai ce chapitre en détaillant certaines propriétés physiques des membranes et spécifiquement dans le cas des GUVs car souvent elles sont mesurables.

Le mécanisme de l'autophagie sera expliqué dans le chapitre 2. Les rôles de ce processus de dégradation dans la cellule seront développés ainsi que les conséquences d'un dysfonctionnement sur l'organisme. Nous verrons que de nombreuses maladies neuro-dégénératives sont accompagnées d'un dysfonctionnement de l'autophagie et que certains cancers sont génétiquement liés à un mauvais fonctionnement de l'autophagie. Ensuite, je décrirai l'organelle de ce mécanisme, l'autophagosome, en détaillant ce qui est connu de sa formation, de ses origines et de sa composition. Le développement de l'autophagosome nécessite l'intervention d'une famille

de protéines nommées Atg que je présenterai. Je m'attacherai à décrire précisément la protéine GABARAP, puisqu'elle est le marqueur de l'autophagosome et est impliquée dans sa formation.

Dans le chapitre 3, je justifierai mon choix de modèle membranaire, les liposomes, qui me permettront d'étudier les interactions entre GABARAP et la membrane. Puis, les deux stratégies de reconstitution de la protéine dans les membranes modèles seront présentées. Ensuite, au travers de deux courtes études sur des petits liposomes, je montrerai l'influence de la composition de la membrane sur l'ancrage de la protéine. Enfin, les deux principales fonctions de la protéine GABARAP seront expliquées ; l'adhésion et la fusion des membranes.

Certains aspects de l'adhésion et de la fusion des membranes par les protéines GABARAP demandent à être précisés. Cependant l'utilisation de petits liposomes ne permet pas de répondre à ces questions restées en suspens. C'est pourquoi, j'ai reconstitué la protéine GABARAP dans des liposomes géants ou GUVs. Pour cela un nouveau protocole basé sur un choc osmotique a été développé. Le chapitre 4 sera donc consacré à la présentation de ce protocole en détail.

Dans le chapitre 5, j'étudierai l'influence de la composition de la membrane sur la distribution et l'oligomérisation de la protéine ancrée. Dans un premier temps, des GUVs avec des microdomaines seront formées dans le but de mimer les rafts présents sur les membranes biologiques. La distribution de GABARAP sur ces domaines lipidiques en fonction de la chaîne du lipide d'ancrage de la protéine sera observée. Ensuite, l'oligomérisation de la protéine sur des bicouches avec et sans domaines sera déterminée au travers de deux expériences, une expérience de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment et une expérience de photoblanchiment par paliers. Nous verrons que la protéine est monomérique ou faiblement oligomérisée sur des bicouches de très faible courbure.

Le chapitre 6 sera consacré à l'étude des interactions en trans de la protéine GABARAP. Cette protéine est connue pour entraîner l'adhésion des membranes, néanmoins la nature de cette interaction est encore indéterminée. Deux scénarios sont possibles, la protéine interagit avec une autre protéine ancrée sur la membrane apposée ou bien directement avec les lipides de la bicouche. Par micromanipulation de deux GUVs de composition contrôlée, je montrerai une interaction homotypique de la protéine GABARAP en trans. Enfin je rechercherai une éventuelle fusion des

membranes due à la protéine GABARAP, cette fonctionnalité de la protéine étant toujours sujette à débat.

Dans le dernier chapitre, je m'intéresserai d'abord au module de courbure d'une membrane avec et sans protéine ancrée à sa surface. Nous verrons que la protéine GABARAP abaisse le module de courbure de la membrane, elle facilite donc sa déformation. Ensuite, la distribution de la protéine sur une membrane possédant plusieurs courbures sera analysée. Cette étude me permettra de proposer un modèle de prédiction du recrutement de la protéine dans des régions de différentes



Chapitre 1

Les membranes

A l'échelle microscopique, les membranes permettent la délimitation de toutes les entités biologiques telles que la cellule et les organelles qu'elle contient. Chacune de ces entités occupe une fonction spécifique et est capable d'interagir avec son environnement. Ces interactions peuvent donner lieu à des réorganisations internes comme des réarrangements de la structure de leur membrane. Nous savons aujourd'hui que la plupart des réorganisations de la membrane nécessitent l'intervention de machineries protéiques qui peuvent agir de différentes façons ; par l'application de forces de l'ordre du pico newton par exemple ou bien par modification des propriétés physiques de la membrane.

Dans ce chapitre, nous aborderons le rôle des membranes biologiques et nous définirons ses deux principaux composants : les lipides et les protéines. Ensuite nous présenterons certains modèles membranaires puis nous discuterons de leurs intérêts dans l'étude des interactions membranes-protéines. Enfin, nous décrirons les propriétés physiques des membranes.

1.1 Les membranes biologiques

La cellule constitue l'unité élémentaire du vivant. Elle est délimitée par sa membrane plasmique (Fig. 1.1) qui constitue une barrière avec le milieu extérieur. Ses fonctions sont assurées par des organelles présentes dans son cytosol telles que les mitochondries, le golgi, le réticulum endoplasmique (ER) (Fig. 1.1)... Ces organelles sont elles-mêmes délimitées par une membrane dont l'aspect peut être très

variable de l'une à l'autre. Prenons pour exemple les mitochondries ou le réticulum endoplasmique ; les mitochondries ont une forme de haricot à double membrane dont la paroi intérieure est parcourue de repliements alors que le réticulum endoplasmique forme des replis et des ramifications. La structure de la membrane d'une organelle peut aussi évoluer en raison de son activité ou en réaction à son environnement. La membrane a donc un rôle actif dans la vie cellulaire.

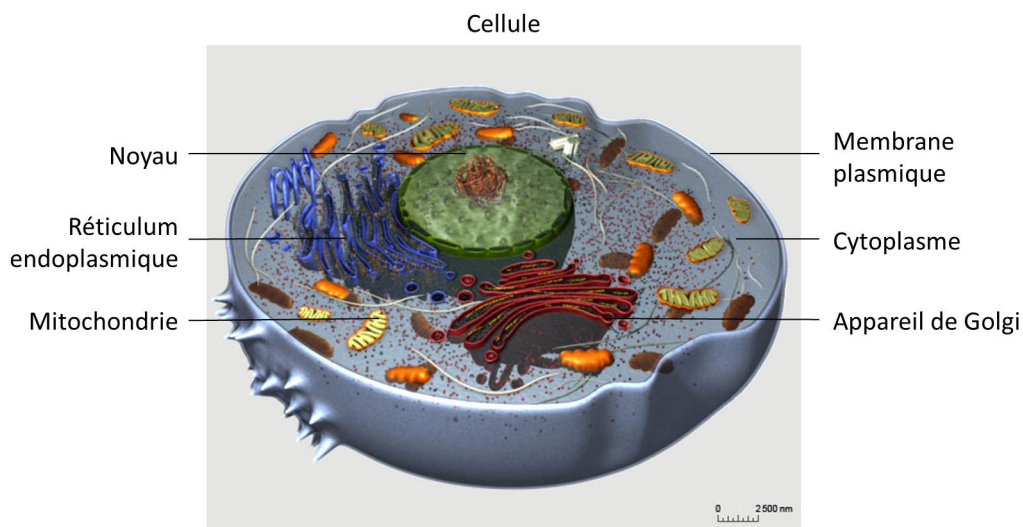


FIGURE 1.1: **Schéma d'une cellule** montrant les principales organelles contenues dans son cytoplasme. L'image est extraite du site <http://cellule.ccdmd.qc.ca/>.

Les réarrangements membranaires s'illustrent au travers de mécanismes d'internalisation comme l'endocytose ou d'externalisation comme l'exocytose (Fig. 1.2). Lors de l'endocytose, la membrane d'une organelle ou de la cellule s'invagine pour capturer des molécules présentes dans son milieu extérieur. La membrane invaginée autour des molécules se scinde de la membrane mère à un moment donné pour former une vésicule interne. L'exocytose est le mécanisme inverse : une vésicule à l'intérieur d'une cellule ou d'une organelle fusionne avec sa membrane afin de libérer son contenu vers l'extérieur. Ces mêmes mécanismes ont lieu dans différents processus biologiques. Ils se différencient par les membranes mises en jeux, les molécules capturées ou relâchées et les protéines impliquées.

A travers deux processus biologiques différents, nous allons illustrer l'endocytose et l'exocytose. Lors du passage du signal nerveux, des neurotransmetteurs sont libérés par exocytose du neurone pré-synaptique. Les neurotransmetteurs ciblent ensuite des récepteurs présents sur la membrane externe du neurone post-synaptique. La

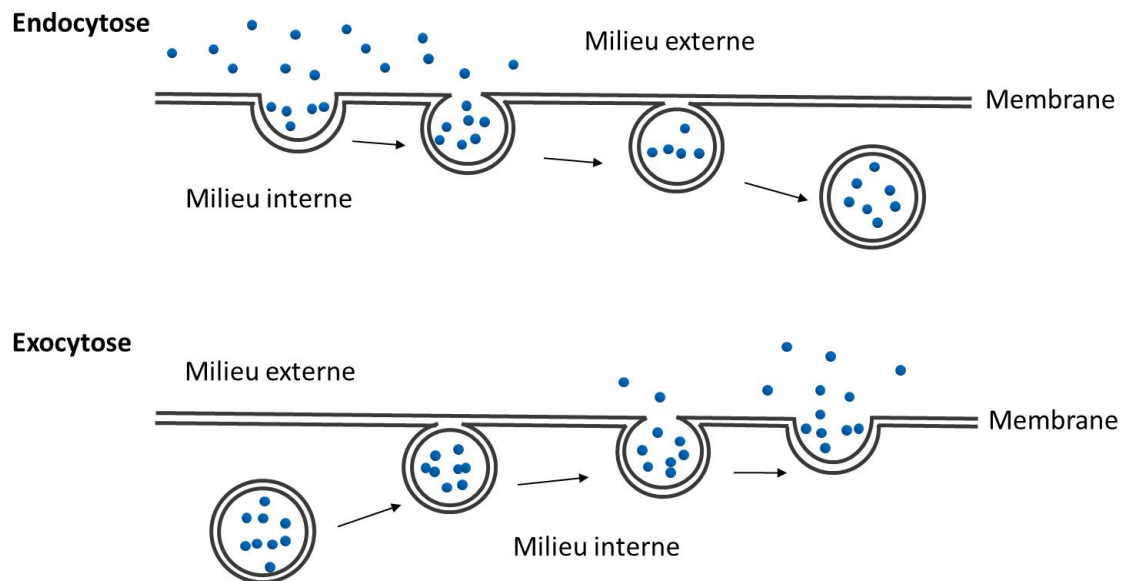


FIGURE 1.2: Schéma des mécanismes d'endocytose et d'exocytose.

fusion des vésicules contenant les neurotransmetteurs avec la membrane du neurone prés-synaptique se fait grâce à un complexe formé par plusieurs protéines SNAREs. Elles forment un trimère ancré dans les membranes qui permet leur mise en apposition et conduit à leur fusion. Ce mécanisme d'exocytose est donc spécifique à la transmission du signal nerveux. A présent, décrivons un autre processus biologique qui implique une endocytose. La micro-autophagie est un mécanisme de dégradation qui consiste en la séquestration directe de molécules contenues dans le cytosol par une organelle, le lysosome, qui détruit les molécules ingérées. La sélection des molécules à dégrader se fait grâce aux protéines solubles hsc70 qui ciblent les molécules défectueuses dans le cytosol [1]. En l'absence de cette protéine, l'activité protéolytique du lysosome diminue.

La plupart des réarrangements membranaires qui ont lieu au cours d'un processus sont associés à des machineries protéiques spécifiques. Ces protéines font partie intégrante de la membrane du vivant, par conséquent elles sont un élément clef dans l'étude des membranes biologiques.

1.2 Les lipides dans la membrane

1.2.1 Phospholipides et stérols

La structure des membranes est due aux molécules amphiphiles qu'elle contient : les lipides. Ces derniers ont une tête hydrophile (qui aime l'eau) et une queue hydrophobe (qui n'aime pas l'eau) (Fig. 1.3). En solution aqueuse, les lipides se réarrangent spontanément afin que leurs chaînes hydrophobes ne soient plus en contact avec l'eau ; soit en monocouches soit en bicouches (Fig. 1.3). Les lipides se structurent en monocouches comme les micelles, s'ils ont une forme conique inversée, ce qui est le cas des détergents. Les queues hydrophobes sont pointées vers l'intérieur de la micelle et les têtes hydrophiles vers l'extérieur en contact avec l'eau. Cependant, la plupart des lipides ont une forme cylindrique et se structurent le plus souvent en bicouche en milieu aqueux. Une bicouche est composée de deux feuillets, les têtes des lipides pointant vers l'extérieur et les queues vers l'intérieur. En général, en solution, les lipides forment des vésicules mais ils peuvent aussi se structurer en lamelles ou en phase éponge par exemple. Les lipides peuvent se décomposer en plusieurs sous familles dont trois sont représentatives des lipides présents dans les membranes biologiques [2] : les phospholipides, les stérols et les sphingolipides. La proportion de ces lipides dans les membranes peut être variable d'une cellule à l'autre et entre les organelles d'une même cellule.

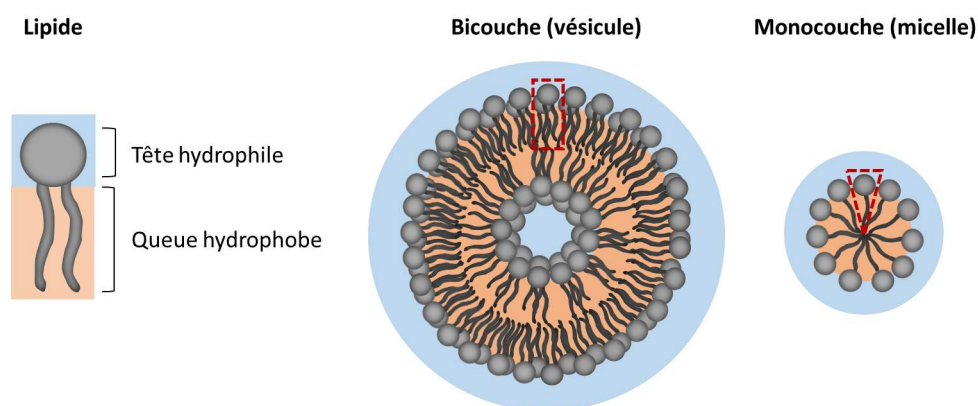


FIGURE 1.3: **Représentation schématique de la réorganisation des lipides.** A gauche, schéma d'un lipide dont la tête est hydrophile (bleu) et la queue hydrophobe (rouge). Au milieu et à droite, représentation schématique de la réorganisation des lipides en bicouche (vésicule) et en monocouche (micelle).

Les phospholipides sont caractérisés au niveau de leur tête hydrophile par un groupement phosphate, un glycérol et un groupement de nature variable tel que

la choline (Fig. 1.4). Le glycérol est estérifié par deux acides gras qui constituent la queue hydrophobe du lipide, chacun étant une chaîne de carbones de 14 à 24 atomes (Fig. 1.4). Des doubles liaisons, nommées insaturations peuvent être présentes au niveau de la chaîne de carbone, leur nombre ne peut dépasser 6 par chaîne. S'il n'y a aucune insaturation les lipides sont dits saturés et, dans le cas contraire, ils sont appelés insaturés. Lorsque le nombre d'insaturation est grand, le terme "polyinsaturé" est employé. La nomenclature utilisée pour définir la partie hydrophobe des lipides indique le nombre de carbone pour chaque chaîne, R1 et R2, suivi du nombre d'insaturations. Prenons comme exemple la POPC dont les chaînes carbonées se notent 16 : 0 et 18 : 1.

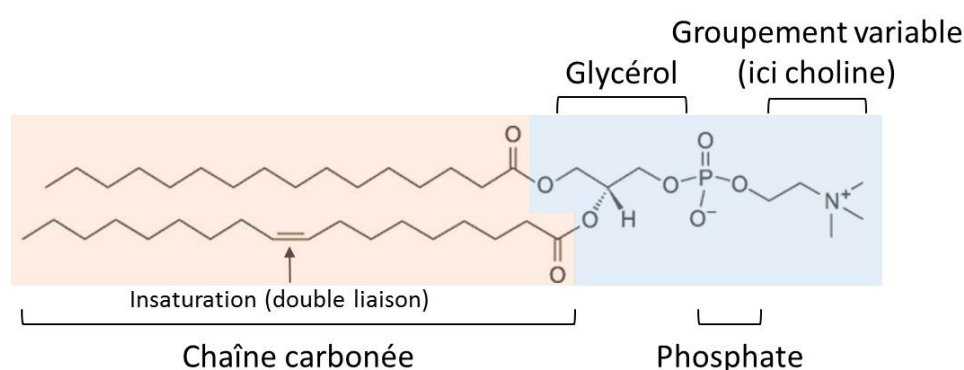


FIGURE 1.4: **Structure chimique du phospholipide POPC.** La queue hydrophobe (rouge) est composée de deux chaînes carbonées, l'une de 16 atomes de carbone (palmitoyl), l'autre de 18 avec une insaturation (oleoyl). La tête hydrophile (bleu) est constituée d'un groupe glycérol, d'un groupe phosphate et d'un groupement variable ici la choline. L'image est extraite du site www.avantilipids.com.

La forme d'un phospholipide dans l'espace est en général assimilée à un cylindre (Fig. 1.5.A). Néanmoins, pour certains phospholipides possédant une petite tête hydrophile comme la phosphatidylethanolamine (PE), la forme du lipide s'assimile plus à un cône (Fig. 1.5.A). Ces différences de forme peuvent jouer sur la courbure de la membrane. C'est le cas notamment si la composition lipidique n'est pas identique sur les deux feuillets de la bicouche (bicouche asymétrique). Alors le feuillet ayant une concentration plus élevée en lipides PE tend à adopter une courbure négative (Fig. 1.5.B). Cette asymétrie en composition engendre une courbure spontanée de la membrane.

Les sphingolipides se différencient des phospholipides par la présence d'un groupement céramide à la place du groupement glycérol (Fig. 1.6). De plus, leurs chaînes

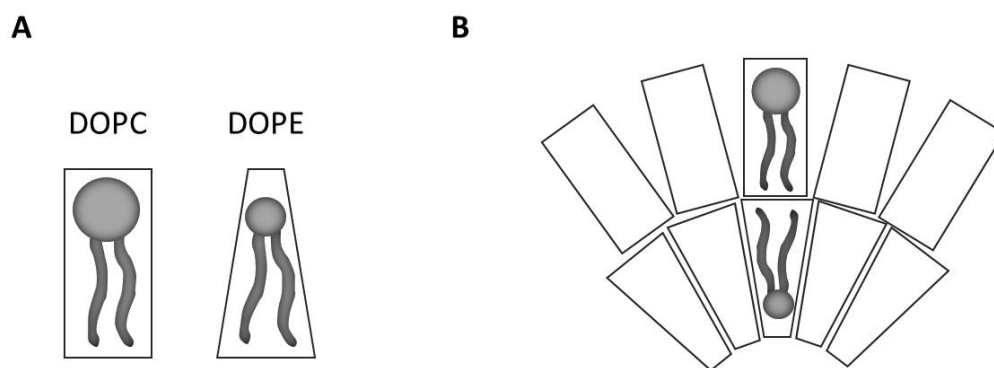


FIGURE 1.5: **Espace occupé par un lipide.** (A) Représentation schématisée de l'espace occupé par un lipide. (B) Schéma d'une membrane dont la composition des feuillet est asymétrique. Le feuillet riche en lipide à forme conique engendre une courbure spontanée de la membrane.

carbonées sont en général plus longues et plus saturées. La sphingomyéline fait partie de cette famille et est très présente au niveau des gaines de myéline entourant les fibres nerveuses.

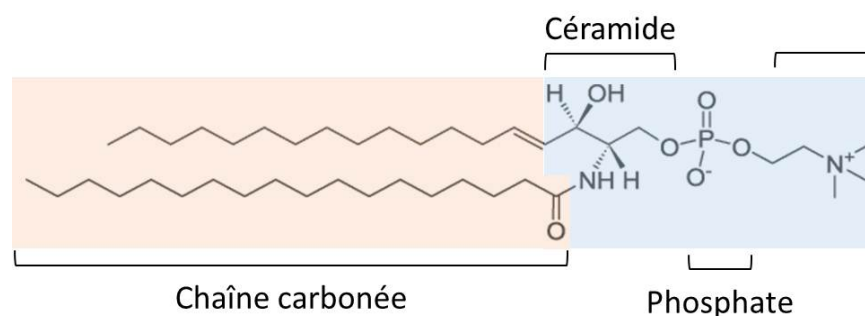


FIGURE 1.6: **Structure chimique de la sphingomyéline.** La queue hydrophobe apparaît en rouge et la tête hydrophile en bleue. L'image est extraite du site www.avantilipids.com.

Les lipides faisant partie de la famille des stérols ont une structure très différente des précédentes. Un des membres de cette famille, le plus répandu dans les membranes biologique, est le cholestérol. Il est constitué d'une très petite tête hydrophile et d'une queue hydrophobe unique très rigide (Fig. 1.7.A). Le cholestérol est plus petit que les phospholipides et plus hydrophobe à cause de la faible taille de la tête. Dans les bicouches, il s'intercale entre les phospholipides (Fig. 1.7.B).

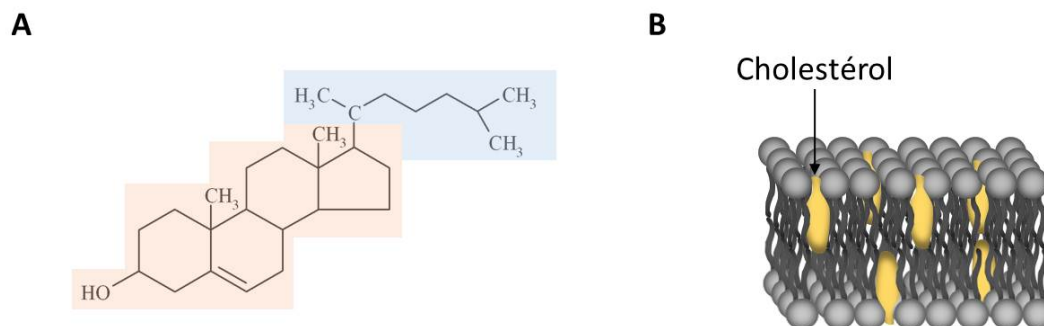


FIGURE 1.7: **Le cholestérol.** (A) Structure du cholestérol. La tête hydrophile figure en bleu et la queue hydrophobe en rouge. L'image est extraite du site www.avantilipids.com. (B) Représentation schématique d'une bicouche contenant du cholestérol.

1.2.2 La membrane : un fluide à deux dimensions

Dans les membranes biologiques les lipides diffusent. L'étude de ces derniers s'assimile donc à celle d'un fluide à deux dimensions. La mobilité des lipides dans la bicouche est en partie due à la faible interaction entre les lipides et à la variabilité de conformation que peut occuper un phospholipide. En effet, au niveau de leurs chaînes carbonées, les liaisons carbone-carbone peuvent pivoter autour de leur axe, la partie hydrophobe des lipides est donc flexible. L'énergie nécessaire pour le passage entre ces différentes conformations est de l'ordre du $k_B T$ qui correspond à l'énergie thermique. Ils peuvent donc avoir lieu spontanément à température ambiante.

La fluidité de la membrane dépend de la longueur et du nombre d'insaturations des chaînes des lipides. Au niveau d'une insaturation la chaîne de carbones forme un coude (Fig. 1.8) ce qui favorise un plus grand désordre dans la bicouche et donc augmente sa fluidité. Inversement des chaînes longues et saturées favorisent une plus grande compaction de la membrane et la rende plus visqueuse. Le cholestérol joue le même rôle en s'intercalant entre les lipides, il favorise la compaction de la membrane.

La bicouche se comporte le plus souvent comme une phase fluide aussi appelée phase liquide désordonnée (l_d) pour des températures physiologiques. Cependant si la température est abaissée en dessous de la température de fusion des lipides (T_M ou bien " melting temperature "), les lipides deviennent rigides et se structurent en phase gel ou solide-ordonnée. Leur diffusion dans la bicouche est alors quasiment

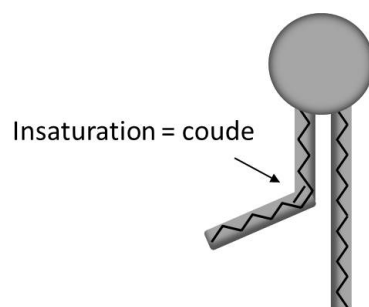


FIGURE 1.8: **Lipide insaturé.** Représentation schématique d'un lipide avec une insaturation (double liaison) formant un coude dans la chaîne carbonée.

nulle (Fig. 1.9). Les T_M sont propres à chaque lipide, elles varient avec la longueur de la chaîne carbonée et le nombre d'insaturations. Plus la chaîne carbonée est longue plus la T_M du lipide augmente [3] et plus le nombre d'insaturation est élevé plus la T_M diminue [4]. La majorité des lipides présents dans les membranes biologiques sont toujours en phase liquide car leur T_M est largement inférieure aux températures physiologiques.

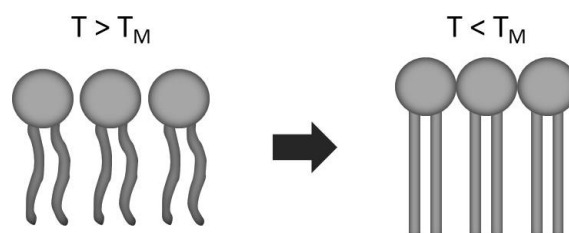


FIGURE 1.9: **Température de transition des lipides.** Représentation schématique de lipides à une température supérieure et inférieure à leur T_M . Lorsque $T > T_M$, les liaisons carbone-carbone pivotent autour de leur axe, les chaînes lipidiques peuvent donc occuper différentes conformations et sont très flexibles. Lorsque $T < T_M$, les chaînes de carbones se rigidifient et leur élancement est maximale, les lipides forment alors une structure compacte.

Les T_M des lipides utilisés dans ce projet sont données dans le tableau en figure 1.10.

1.2.3 Les domaines lipidiques dans les membranes

A présent, imaginons une bicouche formée d'un mélange de lipides saturés, de lipides insaturés et de cholestérol. En dessous d'une température de transition comprise entre les T_M des lipides saturés et insaturés, deux phases se forment

Lipides	R1	R2	T _M (°C)
DOPC	18: 1	18: 1	- 17
POPC	16: 0	18: 1	- 2
DPPC	16: 0	16: 0	41
DOPS	18: 1	18: 1	- 11
POPS	16: 0	18: 1	14
DOPE	18: 1	18: 1	- 16
DPPE	16: 0	16: 0	63
DMPE	14: 0	14: 0	50

FIGURE 1.10: **Lipides utilisés dans le projet.** La longueur et le nombre d'insaturations de chaque chaîne ainsi que les T_M sont précisés.

sur la bicouche, l'une riche en lipides insaturés assimilable à une phase liquide désordonnée (l_d) et l'autre riche en lipides saturés et cholestérol nommée phase liquide ordonnée (l_o). Ces deux phases sont liquides, cependant la phase liquide ordonnée est beaucoup moins fluide car les chaînes des lipides saturés sont rigides comme dans une phase gel et c'est le cholestérol qui permet à la membrane de rester fluide en empêchant une compaction maximale des lipides. Dans la partie 1.2.1, nous avons dit que le cholestérol favorisait la compaction des chaînes, ce qui reste vrai, seulement il empêche une compaction totale. La rigidification des lipides saturés entraîne l'allongement maximal de leurs chaînes carbonées ce qui conduit à un épaissement de la bicouche au niveau d'une phase liquide ordonnée (5 nm) comparé à une phase liquide désordonnée (4 nm)(Fig. 1.11) [5]. Entre elles, les phases sont mobiles et diffusent l'une dans l'autre, de plus elles sont couplées sur les deux feuillets d'une bicouche [6].

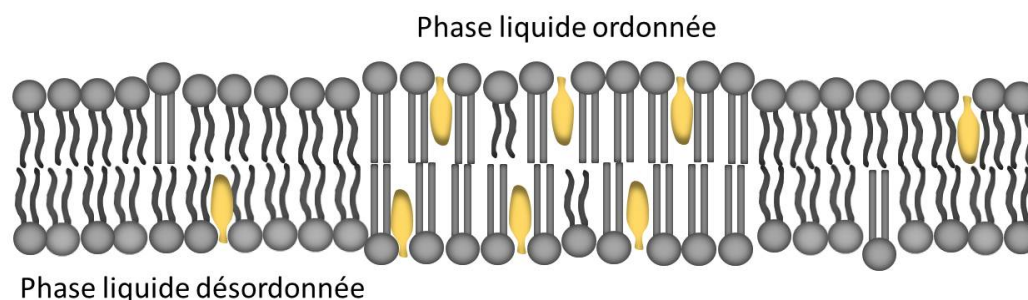


FIGURE 1.11: **Schéma en coupe d'une bicouche comportant deux phases liquides.** Une phase liquide désordonnée riche en lipides insaturés. Une phase liquide ordonnée riche en lipides saturés et cholestérols.

Les phases liquides sur une bicouche portent aussi le nom de domaines, et si leur taille est de l'ordre du micromètre alors elles sont désignées par le terme micro-domaines. Ce terme est couramment employé dans les études effectuées sur des vésicules géantes dont les domaines peuvent mesurer jusqu'à plusieurs dizaines de micromètres (une description plus complète des vésicules sera donnée dans les parties suivantes). Des diagrammes de phases ont été dressés à différentes températures et pour des compositions lipidiques différentes en utilisant des vésicules géantes. Nous prendrons comme exemple un mélange de lipides DOPC/DPPC/cholestérol à température ambiante (Fig. 1.12), puisqu'il est représentatif de nos futures conditions d'expériences [7].

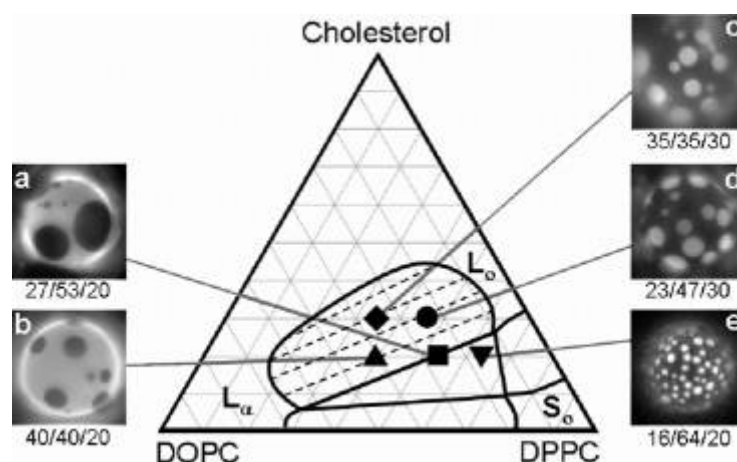


FIGURE 1.12: **Diagramme de phase pour des vésicules composées de DOPC, DPPC et cholestérol à 20 °C et les images des vésicules correspondantes.** Les concentrations en lipides sont indiquées sous les photos en pourcentage molaire, DOPC/DPPC/cholestérol. L_{α} correspond à une phase liquide désordonnée, L_{β} à une phase liquide ordonnée et S_o à une phase gel. La zone centrale parcourue de ligne pointillée correspond à une zone où les phases L_{α} et L_{β} coexistent. Diagramme extrait de [7].

La présence de ces domaines sur les membranes biologiques a été démontrée [8]. Ils sont désignés par le terme rafts cependant ils demeurent très difficiles à observer et à étudier étant donnée leur petite taille de l'ordre du nanomètre. La composition des rafts est tout aussi difficile à évaluer de par les limitations techniques qui ne permettent pas de les isoler et de les extraire des membranes biologiques. Malgré le peu d'information dont nous disposons sur la nature des rafts, leur rôle dans des processus biologiques a été mis en avant à plusieurs reprises, ils permettent par exemple la concentration locale de protéines [9, 10].

1.2.4 Défauts à la surface de la membrane découvrant la partie hydrophobe de la bicouche

La surface d'une bicouche lipidique est formée des têtes hydrophiles des lipides et le cœur de la bicouche des queues hydrophobes. Néanmoins, par endroits la partie hydrophobe de la bicouche reste accessible, ces zones s'apparentent à des défauts membranaires. Leur existence est due à la diffusion permanente des lipides et à leur faible interaction entre eux ce qui ouvre des accès à l'intérieur de la membrane.

La présence de ces défauts à la surface d'une bicouche peut être amplifiée pour certaines compositions lipidiques. Dans une bicouche plate, les lipides possédant des insaturations ou une petite tête, comme les lipides DOPE ou DOG créent des interstices entre les têtes lipidiques (Fig. 1.13.A). Ces résultats ont été montrés par simulation d'une bicouche pour différentes compositions lipidiques : DMPC, POPC, DOPC et DOPC/DOG [11]. La présence de défauts à la surface de la bicouche augmente avec l'insaturation des chaînes carbonées et avec la présence de lipides DOG (Fig. 1.14). Ces défauts induits par des lipides sont similaires à ceux obtenus lorsque la membrane est courbée [11], les têtes des lipides du feuillet courbé positivement s'écartent et donnent accès à la partie hydrophobe de la bicouche alors que celles sur le feuillet courbé négativement se rapprochent (Fig. 1.13.B). Ces défauts à la surface des membranes jouent un rôle biologique car ils sont nécessaires à l'ancrage de nombreuses protéines dans la membrane, ce point sera développé dans la partie suivante.

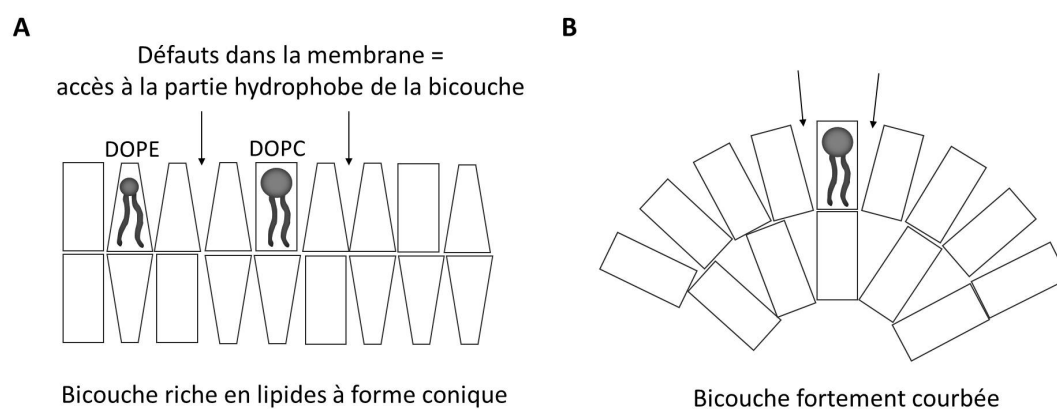


FIGURE 1.13: **Défauts membranaires.** (A) Représentation schématique des défauts présents dans une membrane riche en lipides à forme conique comme les lipides PE. (B) Représentation schématique des défauts (pointés par les flèches noires) à la surface d'une membrane fortement courbée.

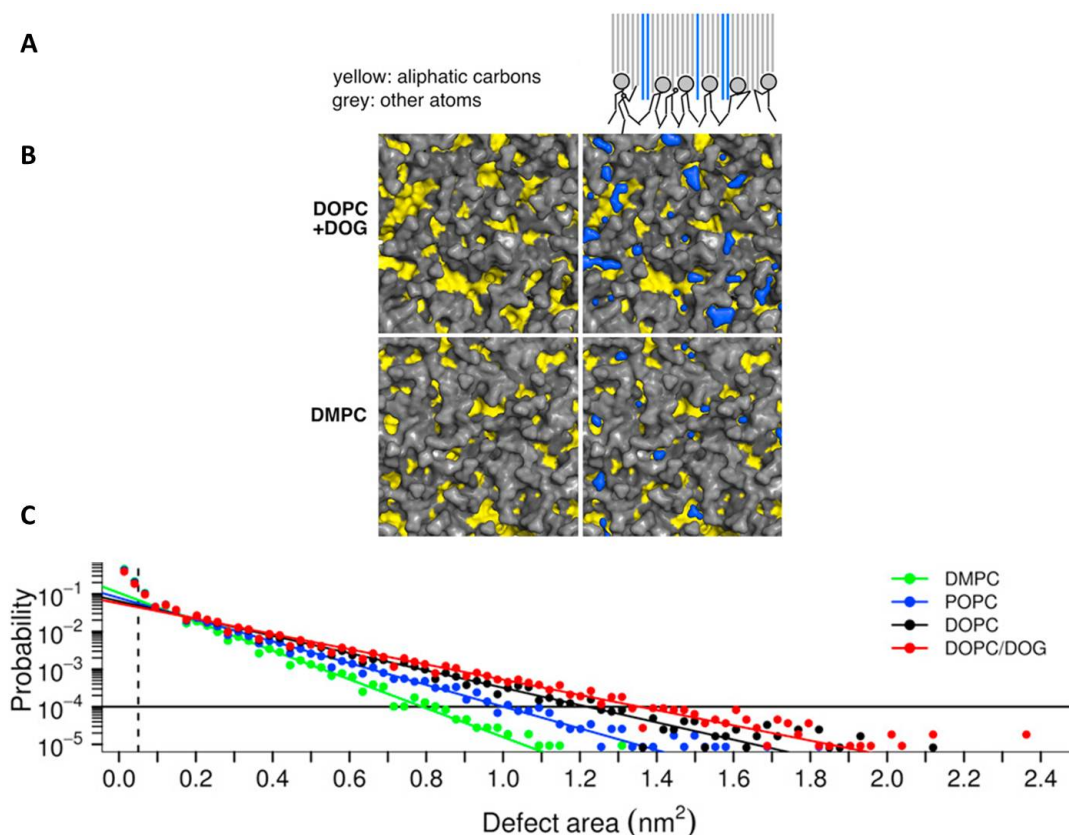


FIGURE 1.14: **Simulation de Vamparys.** (A) Schéma représentant les défauts à la surface de la membrane. (B) Les quatre images montrent des vues de la bicouche par simulation, les têtes lipidiques sont grises et les queues des lipides sont jaunes. Les images sur la colonne de gauche montrent une bicouche pour deux compositions différentes DOPC+DOG et DMPC. Les images sur la colonne de droite montrent les mêmes vues de la bicouche avec les défauts membranaires colorés en bleu. (C) Le graphique donne les probabilités de trouver des défauts d'une aire définie pour des bicouches de quatre compositions différentes DMPC, POPC, DOPC et DOPC/DOG. Extrait de [11]

1.3 Les protéines

1.3.1 La structure des protéines

Une protéine est une chaîne d'acides aminés, aussi désignés par le terme de résidus. Ils sont reliés entre eux par une liaison amide qui résulte de la condensation du groupement carboxylique d'un résidu avec le groupement amine d'un autre. Le résidu à l'extrémité de la chaîne ayant le groupement amine libre constitue le N-terminal et il est considéré comme le premier résidu de la chaîne. Le résidu se trouvant à l'autre extrémité et possédant un groupement carboxyle libre forme le

C-terminal et il est considéré comme le dernier résidu de la chaîne d'acides aminés. La désignation d'un résidu de la séquence d'acides aminés se fait en employant son abréviation (Fig. 1.15) suivie de sa position. Certaines protéines, les protéases permettent le clivage des liaisons amides entre deux résidus spécifiques via une réaction d'hydrolyse.

Acide glutamique	E	Polaire	Leucine	L	Apolaire
Acide aspartique	D	Polaire	Lysine	K	Polaire
Alanine	A	Apolaire	Méthionine	M	Apolaire
Arginine	R	Polaire	Phénylalanine	F	Apolaire
Asparagine	N	Polaire	Proline	P	Apolaire
Cystéine	C	Polaire	Sérine	S	Polaire
Glutamine	Q	Polaire	Thréonine	T	Polaire
Glycine	G	Apolaire	Tryptophane	W	Apolaire
Histidine	H	Polaire	Tyrosine	Y	Polaire
Isoleucine	I	Apolaire	Valine	V	Apolaire

FIGURE 1.15: Liste des acides aminés, de leur abréviation et de leur polarité.

Les protéines ont une structure tridimensionnelle essentielle à leur fonction et leur description peut se faire avec différents niveaux de précision. Le simple énoncé de la séquence d'acides aminés constitue la structure primaire de la protéine. La structure secondaire de la protéine détaille le repliement de la chaîne d'acides aminés sur certains segments en indiquant notamment les hélices α et les feuillets β . La structure tertiaire indique l'agencement des structures secondaires entre elles et donc la structure globale tridimensionnelle de la protéine. Enfin, la structure quaternaire montre les associations de plusieurs chaînes de protéines entre elles.

1.3.2 Les protéines membranaires et exemple de l'hélice amphiphile

Une partie des protéines synthétisées par la cellule interagit avec les membranes et s'y incorpore, ce sont les protéines membranaires. Elles peuvent pénétrer plus ou moins profondément dans la bicouche (protéines intrinsèques), ou bien rester à sa

surface (protéines périphériques). La partie d'une protéine intrinsèque insérée dans la bicouche se nomme le domaine trans-membranaire. Leur structure est optimisée pour interagir avec le cœur hydrophobe de la bicouche, les résidus qui la composent sont donc principalement hydrophobes. Nous pouvons prendre comme exemple trois protéines que nous utiliserons par la suite, les protéines trans-membranaires t-SNARE et TolC et la protéine périphérique GABARAP. La t-SNARE fait partie d'un complexe protéique permettant la fusion de membranes, son domaine trans-membranaire est une hélice α composée en majorité de résidus hydrophobes (Fig. 1.16). La protéine TolC fait partie d'un hétérodimère qui forme une pompe à efflux chez la bactérie *Escherichia coli*, elle est elle-même un homotrimère qui forme un tonneau inséré dans la membrane (Fig. 1.16). La partie externe du tonneau en contact avec l'intérieur de la membrane est composée de résidus hydrophobes en revanche la partie interne du tonneau en contact avec le milieu aqueux est composée de résidus hydrophiles. La protéine GABARAP est une protéine de l'autophagie (son rôle sera développé dans le chapitre suivant), elle est accrochée à la membrane via un lien covalent sur la tête d'un lipide (Fig. 1.16).

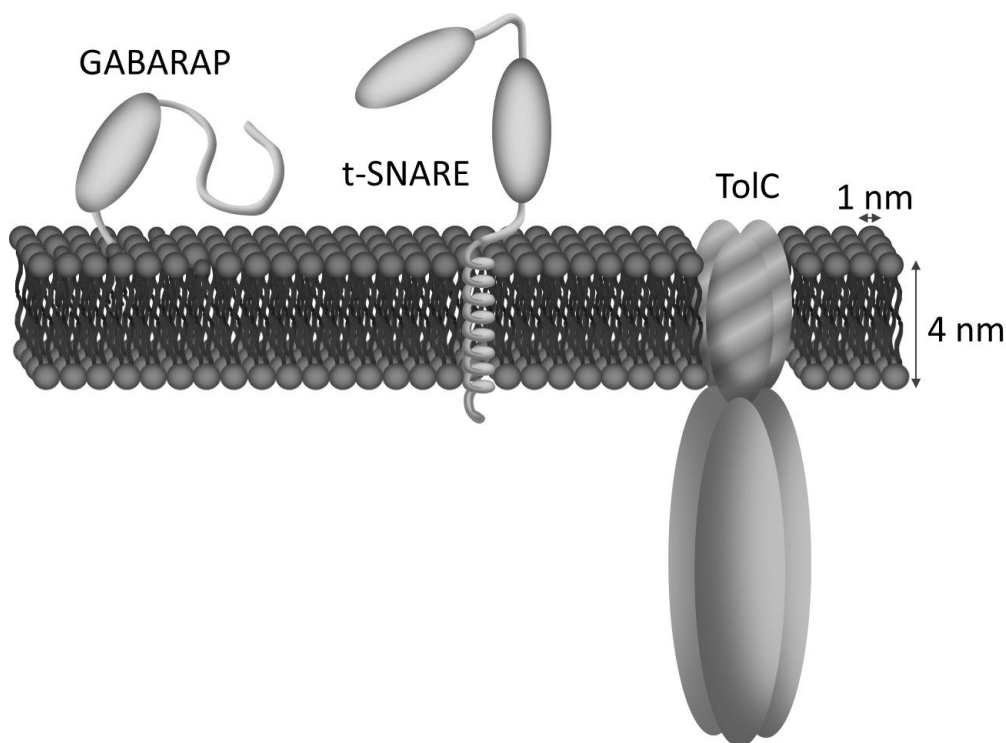


FIGURE 1.16: **Représentation schématique de trois protéines membranaires.** La protéine périphérique GABARAP, la protéine trans-membranaire t-SNARE dont le domaine trans-membranaire est une hélice alpha et la protéine trans-membranaire TolC dont le domaine trans-membranaire est un tonneau.

Certains domaines trans-membranaires comme les hélices amphiphiles ont une structure caractéristique et sont présents dans de nombreuses protéines membranaires [12]. Nous allons détailler la structure de l'hélice amphiphile de la protéine Atg3, une protéine de l'autophagie, dont le rôle sera expliqué dans le chapitre suivant. L'hélice amphiphile d'Atg3 se trouve entre les acides aminés 4 et 26 (Fig. 1.17.A), elle pénètre dans la membrane uniquement sur une face de son hélice (Fig. 1.17.B). Le côté de l'hélice inséré dans la bicouche est formé de résidus hydrophobes (A, I, L, V) alors que le côté en contact avec l'eau est constitué de résidus majoritairement hydrophiles (T, N, E). Le niveau d'insertion de l'hélice est probablement délimité par les résidus hydrophiles K9 et K11. Cette hélice a la particularité d'être sensible aux défauts présents à la surface de la membrane (voir 1.2.4). En effet, le côté de l'hélice s'insérant dans la bicouche est formé de résidus légèrement hydrophobes tels que la valine (V) et la leucine (L) (Fig. 1.17.B) mais pas de résidus fortement hydrophobes comme la tyrosine (Y). L'hélice ne peut donc pénétrer dans la membrane, que si celle-ci présente des défauts. Sur des membranes *in vivo*, ces défauts sont en général dus à une forte courbure de la membrane, c'est pourquoi l'hélice amphiphile d'Atg3 est considérée comme « sensible à la courbure » [13].

1.4 Les membranes modèles

1.4.1 Intérêt des modèles membranaires

La complexité des membranes biologiques a conduit à l'élaboration de bicouches modèles permettant de simplifier les études sur les membranes et leurs interactions avec les protéines. Ces modèles membranaires présentent des avantages majeurs, leur composition en lipides et protéines est parfaitement contrôlée, leur préparation est rapide et leur observation facile. Ils permettent d'isoler les éléments à étudier en fonction de paramètres choisis. Certains champs d'étude sur les membranes ont pu être développés grâce aux modèles membranaires comme l'analyse des propriétés mécaniques des membranes seules et avec des protéines.

Plusieurs modèles membranaires existent, ils se différencient par l'aspect et la structure de leur bicouche. Leur utilisation dépend de la recherche effectuée. Les principaux modèles membranaires sont les suivants : les bicouches supportées, les

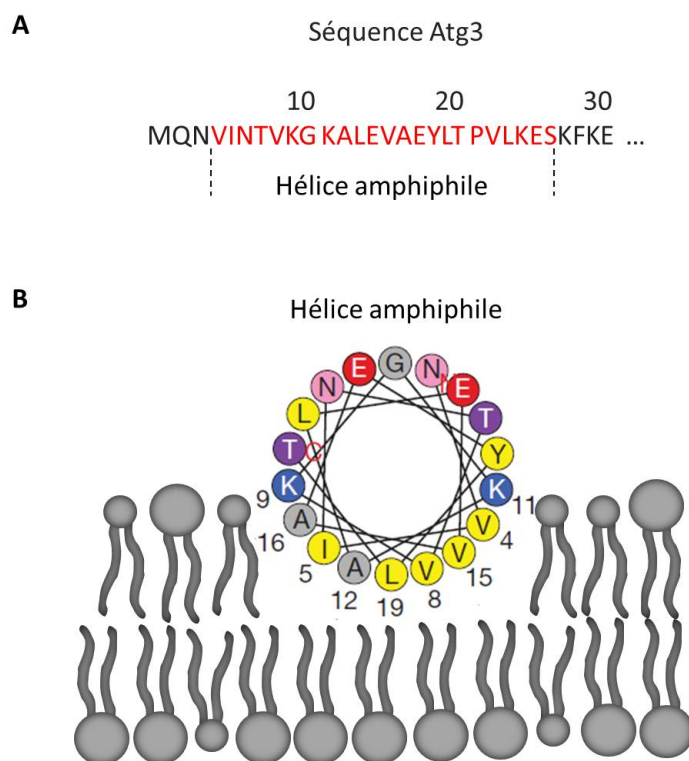


FIGURE 1.17: **L'hélice amphiphile de la protéine Atg3.** (A) Séquence des trente premiers résidus de la protéine Atg3. En rouge sont indiqués les résidus qui forment l'hélice amphiphile. (B) Schéma en coupe de l'hélice amphiphile au N-terminal de la protéine Atg3 (acide aminé 4 – 26) insérée dans la membrane.

nanodisques et les liposomes aussi appelés vésicules (Fig. 1.18) [14]. Cette dernière catégorie peut être subdivisée en trois sous-catégories dépendant du rayon ; small unilamellar vesicle 20 nm-100 nm (SUV), large unilamellar vesicle 100 nm-3 μ m (LUV) et giant unilamellar vesicle 3 μ m-100 μ m (GUV). Le principe de base de fabrication des membranes modèles est le mélange de lipides en solution aqueuse où ils se restructurent spontanément en bicouches à cause de leur nature polaire. Les recherches menées dans ce projet seront effectuées principalement sur des vésicules unilamellaires et plus succinctement sur des bicouches supportées. Des protéines dont les caractéristiques seront développées dans le chapitre suivant, seront reconstituées dans les membranes de SUVs et de LUVs, que nous nommerons par la suite petits liposomes, et de GUVs, afin d'étudier leurs interactions mutuelles. Nous désignerons les petits liposomes et les GUVs portant la protéine par les termes de petits protéo-liposomes et protéo-GUVs.

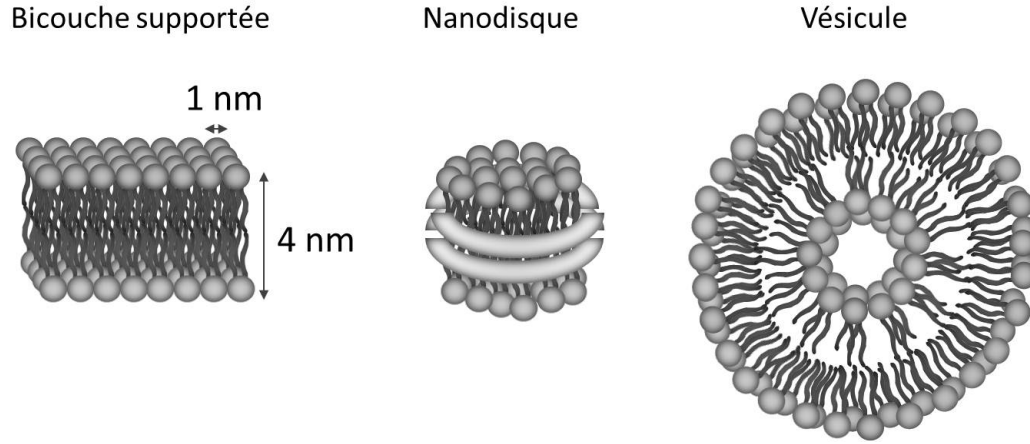


FIGURE 1.18: Différentes structures de bicouches lipidiques

1.4.2 La micromanipulation de GUVs

Les GUVs présentent un avantage majeur, elles peuvent être micromanipulées et visualisées au microscope ce qui permet de contrôler leur position et donne accès à de nombreuses propriétés physiques de leur membrane (développées dans la partie suivante et en annexe H). Les GUVs sont micromanipulées avec des micropipettes en verre dont le diamètre d'ouverture est d'environ 5 μm . Les micropipettes sont remplies d'une solution identique à celle contenue dans les GUVs et sont reliées sans discontinuité à un réservoir d'eau. Une pression d'aspiration ou d'expiration peut être appliquée au bout de la pipette en déplaçant le réservoir sur l'axe des z (Fig. 1.19). La pression d'aspiration se calcule en mesurant la différence de niveau Δz , entre le niveau de la goutte dans l'échantillon et le niveau d'eau dans le réservoir d'eau relié à la micropipette.

$$P_{\text{aspiration}} = \Delta z g \rho_{\text{eau}} \quad (1.1)$$

La pression d'aspiration engendre une tension sur la membrane de la GUV (voir 1.5.1) qui permet de la maintenir en position statique. Dans la plupart de nos expériences, $P_{\text{aspiration}}$ sera de l'ordre de 20 Pa (Fig. 1.20).

Lorsqu'une GUV est aspirée par une micropipette, une partie de la GUV est projetée à l'intérieur de la micropipette et forme une langue (Fig. 1.19). La formation de cette langue est possible si la vésicule non aspirée n'est pas tendue et que sa paroi

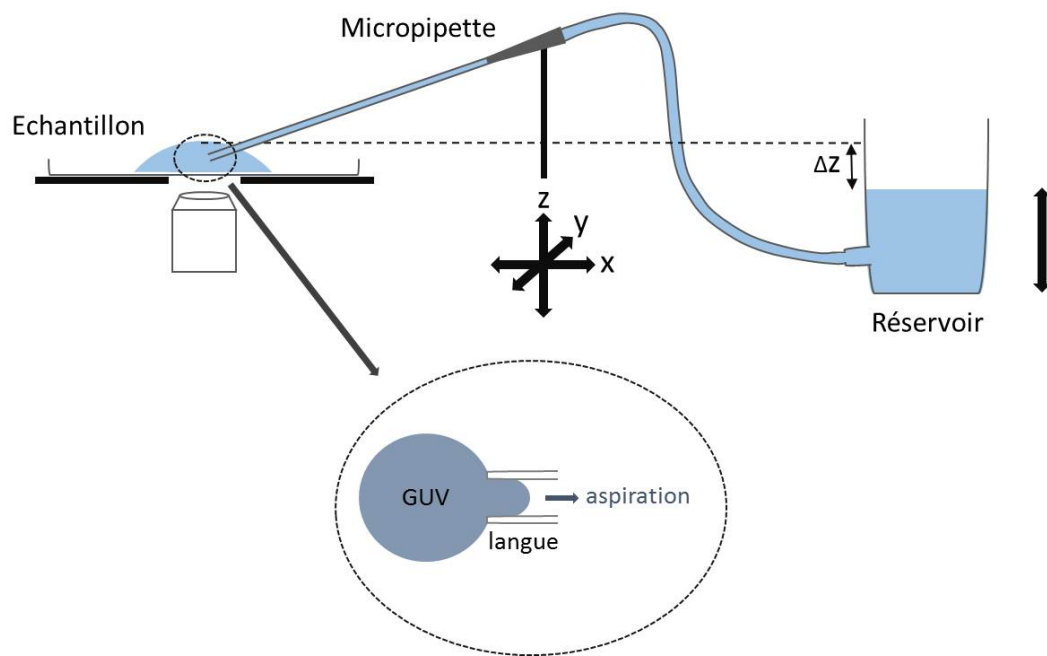
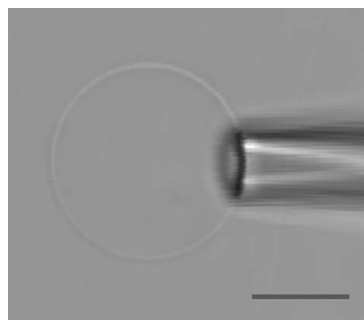


FIGURE 1.19: Schéma du montage d'une micropipette

FIGURE 1.20: **GUV micromanipulée**. Image en contraste de phase. Barre d'échelle : 10 μm .

présente des replis. Lors de l'aspiration la membrane est alors tendue et l'excès de membrane se projette dans la micropipette.

1.5 Propriétés physiques des membranes étudiées sur des GUV

1.5.1 Tension de membrane calculée pour une GUV et tension de lyse

La membrane est caractérisée par sa tension (τ). Dans le cas de vésicules géantes, elle peut être mesurée par micromanipulation. Le rayon de la GUV est noté R_{GUV} , le rayon de la langue dans la micropipette qui correspond au rayon interne de la micropipette R_p , la longueur de la langue L_l et les pressions dans la GUV, P_{GUV} , dans la pipette, P_p , et dans le milieu, P (Fig. 1.21).

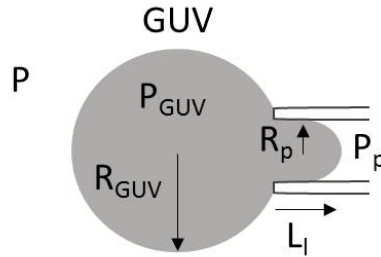


FIGURE 1.21: Schéma d'une GUV aspirée par une micropipette.

La différence de pression entre l'intérieur de la GUV et le milieu est donnée par la loi de Laplace-Young :

$$P_{GUV} - P = \frac{2\tau}{R_{GUV}} \quad (1.2)$$

De la même, la différence de pression entre l'intérieur de la GUV et de la pipette s'écrit :

$$P_{GUV} - P_p = \frac{2\tau}{R_p} \quad (1.3)$$

Ces deux différences de pression ne sont pas accessibles expérimentalement. Cependant en soustrayant ces deux expressions, nous écrivons τ en fonction de paramètres mesurables ; la différence de pression $P - P_p$ qui est la pression d'aspiration appliquée sur la GUV (voir 1.4.2), R_{GUV} et R_p .

$$\tau = \frac{P - P_p}{2\left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_{GUV}}\right)} \quad (1.4)$$

La pression d'aspiration est d'environ 20 Pa (voir 1.4.2), le rayon interne de la pipette est de l'ordre de 2 μm et le rayon de la GUV de 20 μm . La tension de membrane est donc de l'ordre de 0,01 mN/m. Il existe une tension de membrane limite pour laquelle la membrane s'ouvre par formation d'un pore, c'est la tension de lyse. Dans le cas d'une bicouche, elle est de l'ordre de 1 à 5 mN/m, elle varie avec la composition en lipides et protéines de la membrane [15].

1.5.2 Osmolarité d'une solution et perméabilité des membranes

L'osmolarité d'une solution correspond à la quantité de matières par litre de solution (Na^+ , Cl^- , glucose). Elles engendrent une pression osmotique qui se calcule avec la loi de Van't Hoff :

$$P_{osm} = RT Osm \quad (1.5)$$

La pression osmotique se note P_{osm} et s'exprime en Pascal (Pa), R est la constante des gaz parfait et vaut 8,314 U.I., T est la température exprimée en Kelvin (K), Osm est l'osmolarité de la solution exprimé en mosm/L. L'osmolarité physiologique est comprise entre 280 et 300 mOsm. La pression osmotique correspondante à température ambiante est donc d'environ $7 \cdot 10^5$ Pa.

Dans un volume de solution donné, l'osmolarité s'équilibre en tout point du volume. A présent imaginons que ce volume soit scindé en deux par une membrane lipidique et qu'un des sous volumes ait une osmolarité plus élevée (Fig. 1.22). Alors l'osmolarité s'équilibre par passage de molécules à travers la membrane, c'est l'osmose. Cependant, même si les bicouches lipidiques se comportent comme un fluide et sont très flexibles, elles demeurent des barrières infranchissables pour la plupart des molécules comme les ions ou les protéines. Les membranes sont perméables seulement à quelques molécules comme l'eau ou le glycérol. L'équilibrage de l'osmolarité se fait donc par un flux d'eau à travers la membrane, les bicouches étant très perméables à l'eau, 100 $\mu\text{m/s}$ [16], le rééquilibrage est quasi instantané. En

revanche, pour d'autres molécules comme le glycérol, les membranes sont moins perméables, 10 $\mu\text{m/s}$ [17] le flux au travers de la bicouche est donc plus lent ce qui conduit à un régime transitoire avant d'atteindre l'équilibre. Dans le cas de GUVs, ce régime peut durer plusieurs minutes.

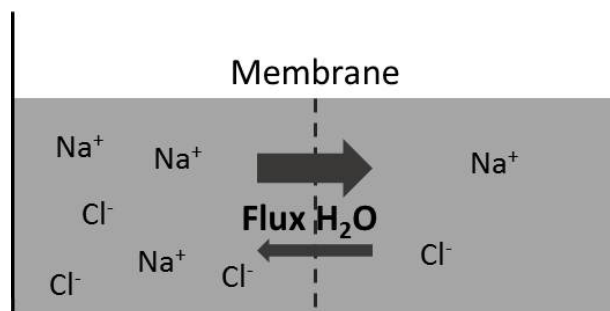


FIGURE 1.22: **Phénomène d'osmose.** Représentation schématique du phénomène d'osmose au travers d'une membrane poreuse à l'eau mais non aux ions.

L'osmolarité des solutions à l'intérieur et à l'extérieur des GUVs doit être contrôlée lors des expériences de micromanipulation afin d'obtenir une langue dans la micropipette. La présence de la langue est indispensable à de nombreuses mesures détaillées dans les parties suivantes. Ici, nous expliquerons comment l'osmolarité de la solution permet l'obtention d'une langue. Si les osmolarités à l'intérieur et à l'extérieur de la GUV sont différentes, des molécules d'eau traversent la membrane afin de rééquilibrer les osmolarités. Supposons à présent que l'osmolarité soit plus élevée à l'intérieur de la GUV alors une plus grande quantité de molécules d'eau traverse la membrane vers l'intérieur de la GUV, cependant peu de molécules d'eau pourront rentrer car la membrane est incompressible. Alors, pour obtenir l'équilibre la membrane de la GUV se tend et les têtes des lipides s'écartent légèrement (Fig. 1.23). En revanche, si l'osmolarité est plus faible à l'intérieur de la GUV, le contraire se produit et la GUV se vide, sa membrane forme alors des replis (Fig. 1.23). C'est ce dernier cas qui nous intéresse lors des micromanipulations, car une fois aspirée, la GUV se tend et le surplus de membrane est projeté dans la pipette et forme une langue.

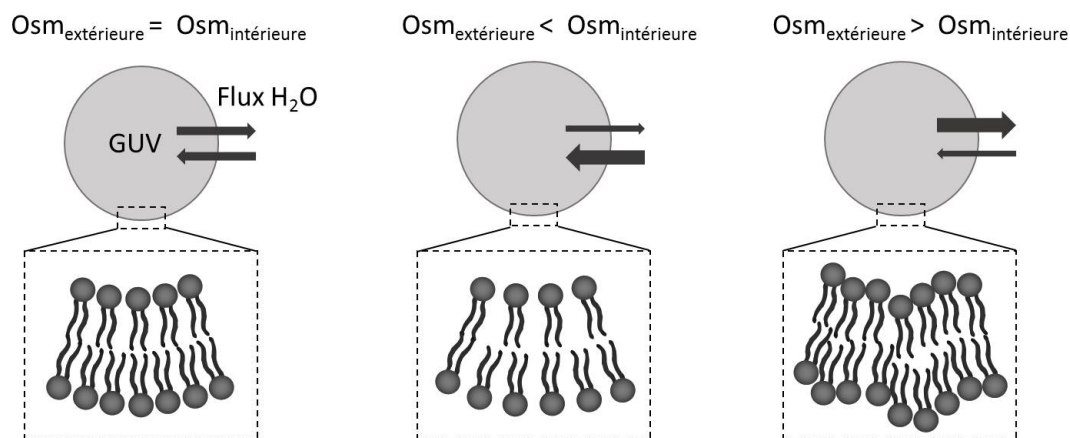


FIGURE 1.23: **Phénomène d'osmose au travers de la membrane d'une GUV.** Représentation schématique de l'osmose au travers de la membrane de GUVs pour différentes configurations initiales d'osmolarité à l'intérieur et l'extérieur.

1.5.3 Surface et volume constants des GUVs

Lorsque les GUVs sont tendues par aspiration avec une micropipette ou bien à cause d'une différence d'osmolarité, la membrane subit une déformation de sa surface. Les lipides s'écartent légèrement ce qui entraîne une dilatation de la membrane (Fig. 1.24).

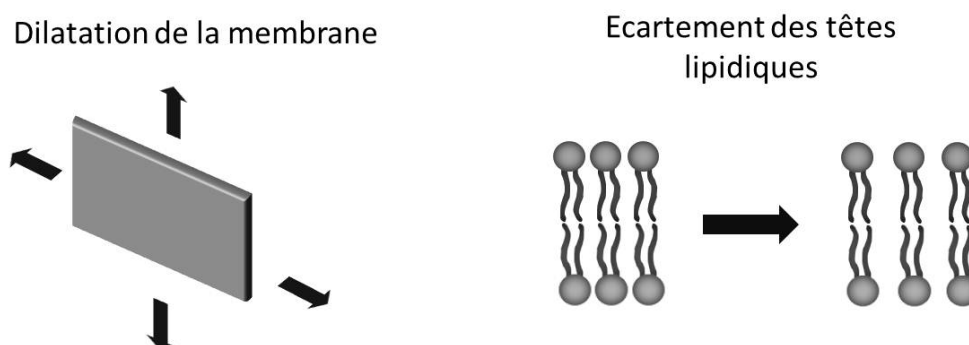


FIGURE 1.24: **Déformation de la membrane par dilatation.** La dilatation de la membrane entraîne un écartement des têtes lipidiques.

Pour une dilatation supérieure à 3%, la membrane s'ouvre et la tension de membrane correspondante est la tension de lyse (voir 1.5.1) [18]. Le changement de surface d'une bicouche est donc faible et cela est dû au coût énergétique élevé pour séparer les lipides. C'est pourquoi les membranes sont considérées incompressibles et l'aire des GUVs constante.

Le volume d'une GUV est aussi invariable car le volume de solution à l'intérieur de la GUV est conditionné par la pression osmotique qui est largement supérieure aux pressions d'aspiration, $P_{\text{osm}} = 7.10^5 \text{ Pa}$ (voir 1.5.2) et $P_{\text{aspiration}} = 20 \text{ Pa}$ (voir 1.4.2) [19].

1.5.4 Energie de courbure de la membrane

L'énergie de courbure d'une membrane a été définie par Helfrich qui écrivit son hamiltonien en fonction de son module de courbure k , de son module de courbure gaussien k^* , des deux courbures principales $C1$ et $C2$ (Fig. 1.25) et de sa courbure spontanée C_0 [20] :

$$H = \int_S \left[\frac{k}{2} (C1 + C2 - C_0)^2 + k^* C1 C2 \right] dS \quad (1.6)$$

Dans le cas d'une membrane, son aire S est fixe comme nous l'avons vu dans le point précédent (voir 1.5.3).

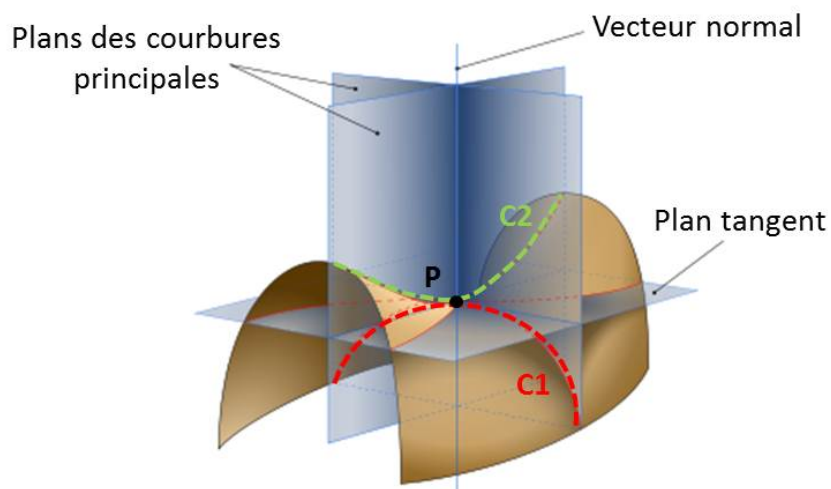


FIGURE 1.25: **Schéma des courbures principales $C1$ et $C2$ d'une surface en un point P .** L'image est extraite du site <http://images.math.cnrs.fr/Gaspard-Monge.html>

Le module de courbure k est l'énergie pour courber la membrane, il correspond donc à l'énergie nécessaire pour écarter les lipides du feuillet courbé positivement et rapprocher les lipides du feuillet courbé négativement. La courbure spontanée C_0 correspond à une courbure préférentielle de la membrane, généralement due

à une différence de composition entre les deux feuillets de la bicouche. Dans le cas d'une bicouche formée de deux feuillets identiques, C_0 est nul. Les GUVs utilisées au cours de ce projet seront symétriques, nous pouvons donc considérer ce paramètre comme nul dans nos études [6]. Le module de courbure gaussien lie les deux courbures principales, la courbure gaussienne est non nulle si la courbure d'un plan dans une direction induit une courbure dans une autre direction. Dans le cas d'une membrane, les courbures principales sont indépendantes, l'énergie de courbure gaussienne est donc nulle.

Calculons l'énergie de courbure d'une vésicule de rayon R . Sa courbure totale $C_1 + C_2$ est égale à $2/R$ et sa surface fait $4\pi R^2$, son énergie est alors de $8\pi k$. L'énergie de courbure de la membrane d'une vésicule est donc indépendante de son rayon.

1.5.5 Module de courbure de la membrane calculé pour une GUV

Le module de courbure d'une membrane (k) caractérise la facilité à déformer la membrane. Plus le module de courbure est faible plus la membrane se déforme facilement. Il peut être mesuré en tirant un tube de membrane de faible rayon d'une GUV (Fig. 1.26), le détail expérimental de l'extraction du tube et la mesure de son rayon (R_t) seront donnés dans la partie 7.2 et dans l'annexe K, ici nous donnerons une explication théorique.

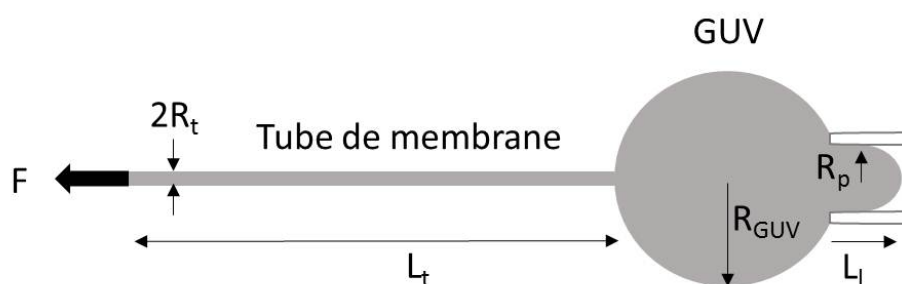


FIGURE 1.26: Schéma d'un tube de membrane de faible rayon extrait d'une GUV.

La force (F) nécessaire à l'extraction du tube peut s'écrire de deux façons, l'une en fonction du module de courbure k et de R_t :

$$F = \frac{2\pi k}{R_t} \quad (1.7)$$

Cette expression signifie que plus le module de courbure est élevé et plus l'extraction du tube nécessite une force importante. La force d'extraction est aussi inversement proportionnelle au rayon tube, car plus le tube est petit, plus la courbure à la base du tube est élevée ce qui énergétiquement est couteux et donc nécessite un apport d'énergie lors de sa formation plus élevé.

La force (F) nécessaire à l'extraction du tube peut aussi s'écrire fonction de la tension de membrane (τ) et du rayon du tube :

$$F = 4\pi\tau R_t \quad (1.8)$$

La force d'extraction doit donc être plus élevée si la membrane est plus tendue et le rayon du tube élevé.

En égalisant ces deux expressions nous obtenons une expression du module de courbure en fonction de paramètres mesurables :

$$k = 2R_t^2\tau \quad (1.9)$$

Le rayon du tube extrait est donc plus faible quand la membrane se déforme facilement à tension égale. Avec cette méthode, le module de courbure d'une membrane a déjà été mesuré et il est de l'ordre de 10^{-19} J soit environ $25 k_B T$ [21]. Il peut varier avec la composition de la membrane en lipides et protéines mais il reste du même ordre de grandeur. Le module de courbure d'une bicouche est donc 10 à 100 fois supérieur à $k_B T$ ce qui explique la facilité avec laquelle les membranes se déforment.



Chapitre 2

L'autophagie

L'autophagie est un processus de dégradation intracellulaire nécessaire à l'équilibre de la cellule. Dans ce chapitre, nous développerons le rôle de l'autophagie dans la cellule et les impacts que peuvent avoir un dysfonctionnement de ce mécanisme au niveau de l'organisme. Ensuite, nous décrirons plus précisément l'organelle de l'autophagie, l'autophagosome, et nous verrons que de nombreuses questions sur sa formation restent ouvertes. Enfin, nous présenterons les familles de protéines impliquées dans ce mécanisme et plus particulièrement la famille de protéines Atg8/LC3 qui sont les seules protéines spécifiques à l'autophagosome connues à ce jour.

2.1 Le rôle de l'autophagie dans la cellule

2.1.1 Principe de l'autophagie

L'autophagie est indispensable à l'homéostasie de la cellule, elle permet le recyclage d'organelles et de protéines défectueuses ainsi que l'élimination d'agents infectieux au travers d'un cycle de dégradation. Ce mécanisme intervient dans tous les organismes eucaryotes de la levure au mammifère [22]. Il existe différents types d'autophagie, les plus importants étant la "chaperon mediated autophagy" (CMA), la microautophagie et la macroautophagie [23, 24]. Leur principe est commun mais leur fonctionnement différent, nous allons donc les décrire succinctement.

La CMA dégrade uniquement des protéines solubles ayant perdu leur conformation tridimensionnelle, par leur translocation directe à l'intérieur du lysosome. Le lysosome est l'organelle permettant la digestion intracellulaire, il a été découvert par De Duve dans les années 50. Il contient des enzymes permettant l'hydrolyse des molécules en milieu acide (pH 5) [25]. Deux protéines interviennent dans la sélection et le transfert à travers la membrane du lysosome de la protéine à dégrader. La première est la protéine hsc70, soluble, qui cible les protéines défectueuses dans le cytosol, la deuxième LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein) est trans-membranaire et ouvre un passage dans la membrane du lysosome (Fig. 2.1).

La microautophagie et la macroautophagie permettent la dégradation de façon ciblée ou non ciblée de structures plus larges. La microautophagie est la séquestration directe de molécules contenues dans le cytosol par le lysosome via une endocytose, comme décrite dans la partie 1.1 (Fig. 2.1). Les mécanismes moléculaires sous-jacents permettant la sélection et le transport des molécules à dégrader vers le lysosome sont encore très peu connus dans les organismes eucaryotes [1].

Lors de la macroautophagie, les molécules à dégrader sont d'abord séquestrées dans une organelle appelée autophagosome dont la paroi est constituée d'une double membrane. Puis l'autophagosome (sa formation sera développée dans la partie 2.2.1) fusionne avec le lysosome par sa membrane externe pour former l'autolysosome. Le contenu de l'autophagosome est alors recyclé par hydrolyse (Fig. 2.1). Les macromolécules issues de la dégradation, comme des acides aminés dans le cas de protéines dégradées, sont relâchées dans le cytosol grâce aux protéines perméases et peuvent être réutilisées dans d'autres processus.

Notre projet porte sur la macroautophagie, dans le but de simplifier les dénominations, nous la désignerons par le terme d'autophagie.

2.1.2 Fonctions et dysfonctions de l'autophagie

L'autophagie est nécessaire à l'équilibre de la cellule et tout dysfonctionnement peut être létal. En effet, dans les organismes où l'autophagie est bloquée, la mort cellulaire est accélérée, les raisons peuvent être multiples comme l'accumulation de molécules défectueuses dans le cytosol [26, 27]. De même, une surexpression de

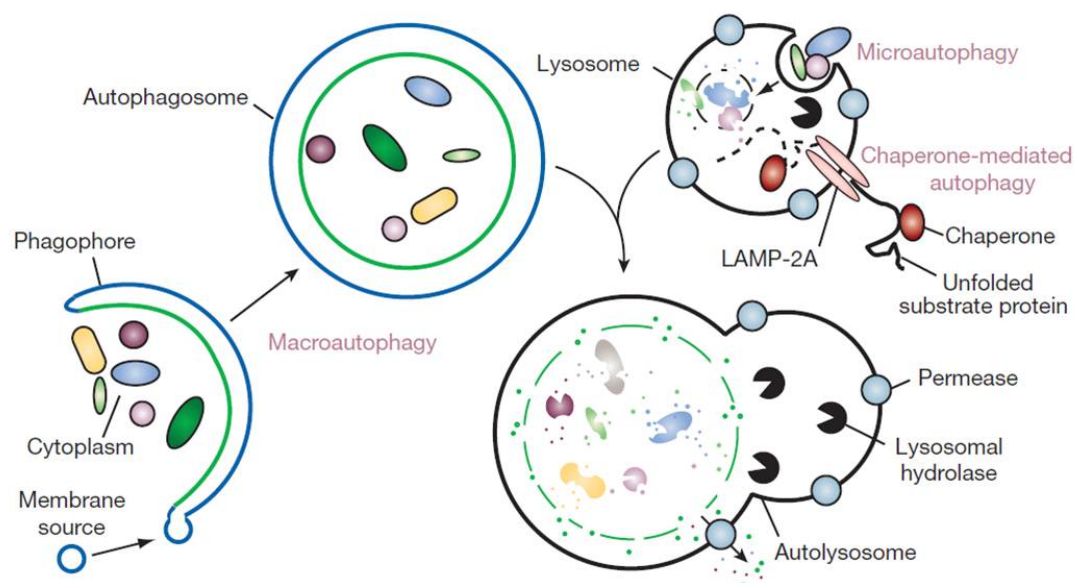


FIGURE 2.1: **Schéma de la chaperon mediated autophagy, de la microautophagie et de la macroautophagie.** Extrait de Mizushima 2008.

l'autophagie entraîne la mort de l'organisme, probablement à cause d'une dégradation massive et non spécifique du matériel cellulaire [23]. Dans cette partie, nous développerons d'abord les rôles d'une autophagie fonctionnelle dans l'organisme puis les conséquences d'un dysfonctionnement. Il est important de noter que l'autophagie intervient dans des mécanismes biologiques très différents et que ses rôles ne sont pas toujours définis de façon exacte, ce qui peut expliquer que certaines fonctions semblent paradoxales.

Le recyclage du matériel cellulaire permet de nettoyer la cellule mais il est aussi impliqué dans des processus plus complexes. Lorsqu'un organisme est en manque de nutriments et les cellules en manque d'énergie, une autophagie non ciblée et massive recycle du matériel cellulaire afin de produire de l'énergie. Par exemple, des plantes ou des levures pour lesquelles l'autophagie a été bloquée survivent beaucoup moins longtemps à une déplétion de nutriments que les plantes et levures normales [22, 23, 28]. Le manque de nutriment est souvent utilisé comme facteur déclencheur de l'autophagie lors d'études effectuées sur les cellules.

L'autophagie peut être utilisée comme un système de survie mais paradoxalement, il est avéré qu'une forme d'apoptose par l'autophagie existe. La différenciation des mécanismes de régulation de ces deux fonctions de l'autophagie et leurs interactions mutuelles restent obscures et sont toujours le sujet de recherches [23]. Il a

été observé que des protéines entraînant l'apoptose de la cellule, comme les protéines BH3, déclenchaient aussi l'autophagie [29]. Et inversement des protéines inhibitrices de l'apoptose, comme la famille de protéines Bcl-2, inhibaient aussi l'autophagie [30–32]. La mort cellulaire par l'autophagie consiste en la destruction ciblée des structures vitales de la cellule via des mécanismes de sélections encore inconnus à ce jour [33].

L'autophagie joue aussi un rôle dans l'élimination d'agents infectieux tels que des bactéries et des parasites qui parviennent à pénétrer dans le milieu intracellulaire. La reconnaissance des pathogènes se fait via des mécanismes qui sont quasiment inconnus aujourd'hui. Des autophagosomes, largement plus grands que ceux observés habituellement lors de l'autophagie non sélective, ont été remarqués autour de structures pathogènes ce qui indique une capacité de l'autophagie à s'adapter à des plus larges structures lorsque celles-ci représentent un danger pour la cellule. Dans certaines maladies caractérisées par l'accumulation de protéines dans le cytosol comme les maladies neurodégénératives (Huntington, Parkinson, Alzheimer), l'autophagie agit en ciblant et en détruisant les agrégats protéiques [23]. Dans certains cancers, l'autophagie a un rôle double, elle cible et détruit les organelles endommagées, ce qui limite l'apparition des tumeurs, et réduit les instabilités du génome. En effet, une augmentation d'ADN endommagé a été observée dans les organismes ayant subi une délétion des protéines de l'autophagie beclin 1 et Atg5, néanmoins les mécanismes précis liant l'autophagie à la stabilité du génome sont encore inconnus [23, 34].

Malgré le rôle bénéfique joué par l'autophagie face aux maladies précédemment citées, ses actions sont en général limitées car les maladies elles-mêmes sont accompagnées d'un dysfonctionnement de l'autophagie [35]. Dans les maladies de Huntington et Parkinson, le dysfonctionnement provient d'une mauvaise séquestration des agrégats protéiques qui s'accumulent dans la cellule [24]. Alors que dans la maladie d'Alzheimer, c'est la dégradation de l'autophagosome par le lysosome qui est perturbée [24]. Dans la maladie de Crohn's qui est une maladie inflammatoire du petit intestin et qui consiste en la mauvaise dégradation de bactéries, les patients sont plus susceptibles de présenter des mutations de trois gènes codants pour des protéines de l'autophagie [24, 36]. Ces mutations ont pour conséquences une mauvaise induction de l'autophagie [24].

Certains cancers, comme le cancer du sein, des ovaires ou de la prostate sont génétiquement liés à un dysfonctionnement de l'autophagie. Dans 40 à 75 % des cas, le

gène ATG, beclin 1, impliqué dans les premières étapes de la formation de l'autophagosome, est délété sur un allèle ce qui entraîne une diminution de l'autophagie. Un dernier exemple peut être donné par la bactérie *Legionella* qui manipule les systèmes de transport membranaire afin de créer une vacuole dans la cellule lui permettant de se répliquer. Elle peut interférer directement avec l'autophagie en produisant une protéine RavZ qui clive les protéines de l'autophagie Atg8 pour les rendre inopérantes ce qui limite la formation des autophagosomes [37].

2.2 L'autophagosome

2.2.1 Formation de l'autophagosome

La découverte de l'autophagie remonte aux années 1960. Elle découle directement de la découverte du lysosome par De Duve en 1949 dans des cellules du foie [38, 39]. Le lysosome est l'organelle permettant la digestion cellulaire comme nous l'avons décrit précédemment. Grâce à l'invention du microscope électronique, les lysosomes ont pu être observés dans le cytosol et dans différents types cellulaires [40]. Au même moment d'autres vésicules étaient observées, celles-ci permettant la séquestration d'une portion du cytosol et son transport vers le lysosome. Ces vésicules étaient qualifiées de pré-lysosome. De Duve comprit qu'il s'agissait d'un processus à part entière et le nomma autophagie, les vésicules séquestrant les molécules à dégrader furent appelées autophagosomes. Les premières recherches sur l'autophagie étaient réalisées au microscope électronique, elles ont notamment permis de déterminer le cycle de formation des autophagosomes (Fig. 2.2).

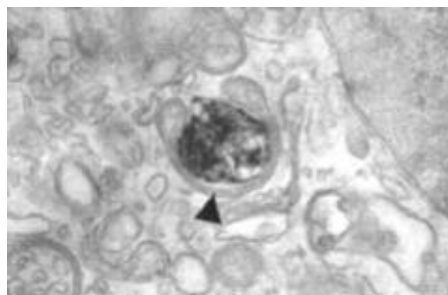


FIGURE 2.2: **Photo d'un autophagosome en formation au microscope électronique** (flèche noire). Extrait de [41].

L'autophagosome se forme dans le cytoplasme par nucléation de membranes isolées dont l'origine est toujours très discutée (voir la partie suivante 2.2.2), cette structure naissante se nomme le phagophore (PA). Le PA croît en forme de coupe en séquestrant des molécules à dégrader présentes dans le cytosol. Puis, il se referme sur ces molécules par fusion de ses bords et forme une vésicule à double membranes appelée autophagosome. Dans la dernière étape, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le lysosome et le contenu de l'autophagosome est dégradé (Fig. 2.3) [42]. Le microscope électronique a permis l'observation des autophagosomes en formation mais ne permettait pas d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents supportant la formation de l'autophagosome.

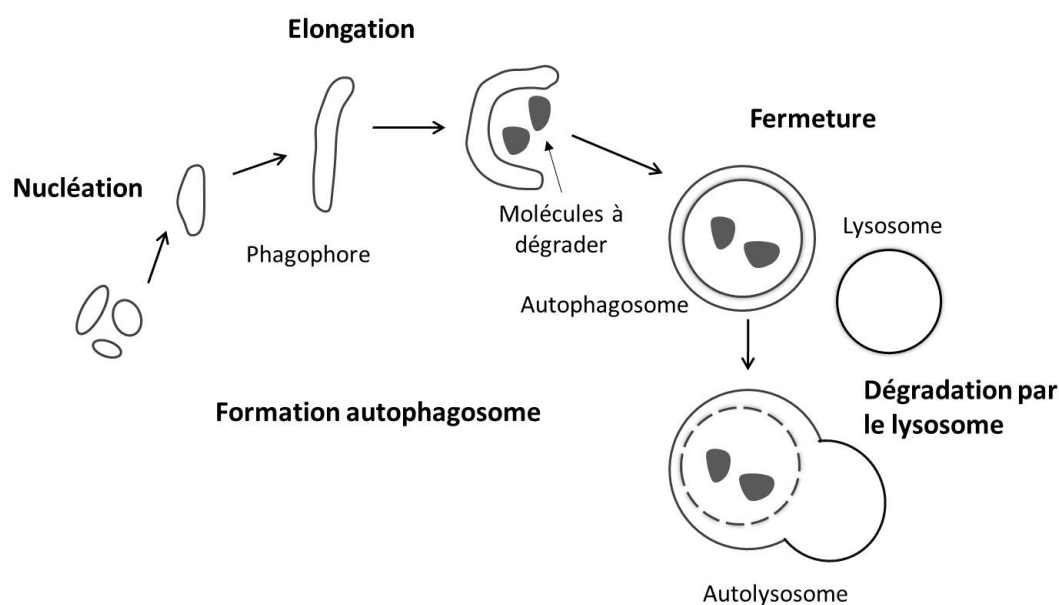


FIGURE 2.3: Schéma du cycle de formation de l'autophagosome

En 1992, les recherches sur l'autophagie prirent une nouvelle dimension, lorsqu'Oshumi identifia ce processus dans un modèle expérimental, la levure. Cette découverte donna accès à l'étude des machineries moléculaires propres à l'autophagie [43]. Nous détaillerons les différentes machineries protéiques participant à la formation de l'autophagosome dans la partie 2.3.

2.2.2 Origine et composition de l'autophagosome

L'origine de la membrane du PA est très discutée, le réticulum endoplasmique (ER) et les mitochondries sont des candidats potentiels comme donneurs de membrane.

Dans une étude menée par Axe et al., il a été observé que les lipides PI(3)P présents sur l'ER se relocalisent partiellement sur les autophagosomes en cas de déplétion de nutriments (Fig. 2.4) [44]. Les lipides PI(3)P sont marqués avec la protéine DFCP1 et les autophagosomes sont localisés grâce à la protéine LC3 qui s'ancore sur leur membrane (la liaison de LC3 à la membrane sera détaillée dans la partie 2.3.4). La membrane des autophagosomes peut donc partiellement trouver son origine dans la membrane de l'ER.

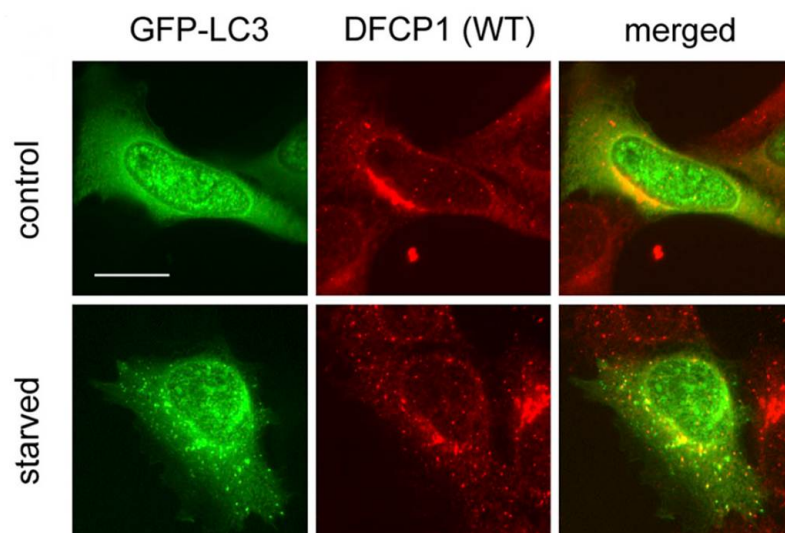


FIGURE 2.4: **Origine de la membrane de l'autophagosome dans l'ER.** Cellules HEK-293 exprimant DFCP1 et transfectées avec la protéine GFP-LC3. Les cellules ont subi une déplétion de nutriments de 90 min entre le contrôle (photo en haut) et les cellules affamées (photos en bas). Barre d'échelle : 20 μ m. Extrait de [44].

Hailey montre que lors d'une déplétion de nutriments les lipides fluorescents NBD-PS présents sur la paroi externe des mitochondries se colocalisent avec la protéine de l'autophagosome LC3 [45]. La membrane externe des mitochondries pourrait donc être au moins partiellement une source pour les autophagosomes en formation (Fig. 2.5). Les origines de la membrane de l'autophagosome semblent donc être multiples. Toutefois, les mécanismes régulant le choix des sources des membranes demeurent des problématiques largement ouvertes.

Une autre question porte sur la composition lipidique de l'autophagosome. Elle n'a toujours pas été établie, puisque avec les techniques existantes il est difficile d'extraire la membrane de l'autophagosome du reste du lipidome. La connaissance de l'origine de sa membrane pourrait renseigner sa composition cependant elle est elle-même très discutée et semble variée, comme nous l'avons vu. Nous ne pouvons

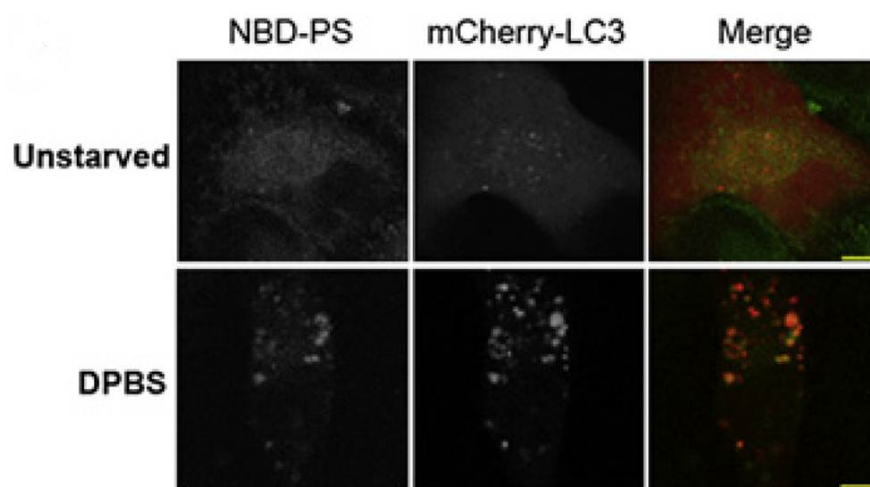


FIGURE 2.5: **Origine de la membrane de l'autophagosome dans les mitochondries.** Cellules NRK transfectées avec la protéine mCherry-LC3 et dont les mitochondries présentent des lipides NBD-PS. Après déplétion de nutriments le signal fluorescent du NBD s'accumule sur les autophagosomes marqués par la protéine LC3. Barre d'échelle : 5 μm . Extrait de [45].

donc qu'émettre des hypothèses sur la composition de l'autophagosome en prenant en compte les compositions déjà connues du lipidome et des organelles de la cellule (Fig. 2.6) [2, 46]. Dans le cas d'études *in vitro* sur des protéines de l'autophagie en interaction avec des membranes modèles, les bicouches lipidiques sont en général composées de phospholipides insaturés (PE, PC, PS) et de cholestérol (Fig. 2.7).

2.2.3 Morphologie de l'autophagosome lors de sa formation

La forme de l'autophagosome évolue au cours de sa croissance. Au départ le PA adopte une forme de coupe, puis en grandissant il tend à se refermer et adopte une forme plus sphérique pour finalement se refermer et former une vésicule à double membranes. Ces changements de morphologie de la membrane ont immédiatement intrigué les chercheurs qui ont alors étudié les mécanismes sous-jacents permettant de telles modifications.

Des études menées sur des cellules, dans lesquelles l'autophagie avait été induite, ont révélé au microscope électronique et à la tomographie 3D que l'ER formait un moule pour le PA croissant (Fig. 2.8) et agirait comme un guide ce qui permettrait au PA d'adopter cette forme de coupe [47]. Lorsque le PA avait achevé sa croissance et était devenu un autophagosome alors la partie de l'ER constituant



Sub-cellular fraction	% of total phospholipid						
	PC	PE	PI	PS	CL	PA	Others
Plasma membrane	16.8	20.3	17.7	33.6	0.2	3.9	6.9
Secretory vesicles, <i>sec1 (sec6-4)</i> ^a	35.0 (37.6)	22.3 (19.5)	19.1 (19.5)	12.9 (16.8)	0.7	1.2	8.8 (6.7)
Golgi ^b	~26	~25	~27	~24	—	—	—
Heavy microsomes	45.2	21.9	11.4	8.0	1.0	4.1	5.6
Light microsomes	49.6	22.6	8.0	9.6	0.7	2.1	4.5
Nucleus	44.6	26.9	15.1	5.9	<1.0	2.2	4.3
Vacuoles	46.5	19.4	18.3	4.4	1.6	2.1	7.7
Peroxisomes	48.2	22.9	15.8	4.5	7.0	1.6	—
Mitochondria	40.2	26.5	14.6	3.0	13.3	2.4	—
Inner mitochondrial membrane	38.4	24.0	16.2	3.8	16.1	1.5	—
Outer mitochondrial membrane	45.6	32.6	10.2	1.2	5.9	4.4	—
Mitochondrial membrane contact sites ^c	31.1	34.9	4.9	0.4	17.0	0.9	10.8
Lipid particles ^d	36.4	20.0	31.6	5.4	ND	2.7	3.9

FIGURE 2.7: **Composition en phospholipides des organelles de *Saccharomyces cerevisiae*.** PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidylethanolamine ; PI, phosphatidylinositol ; PS, phosphatidylserine ; CL, cardiolipin ; PA, phosphatidic acid ; ND, not detectable. Extrait de [46].

le moule externe n'était plus visible. Une autre observation sur ces mêmes expériences supportait l'hypothèse d'une origine de la membrane de l'autophagosome dans l'ER en montrant une connexion de la membrane moule de l'ER avec le PA (Fig. 2.9) [48].

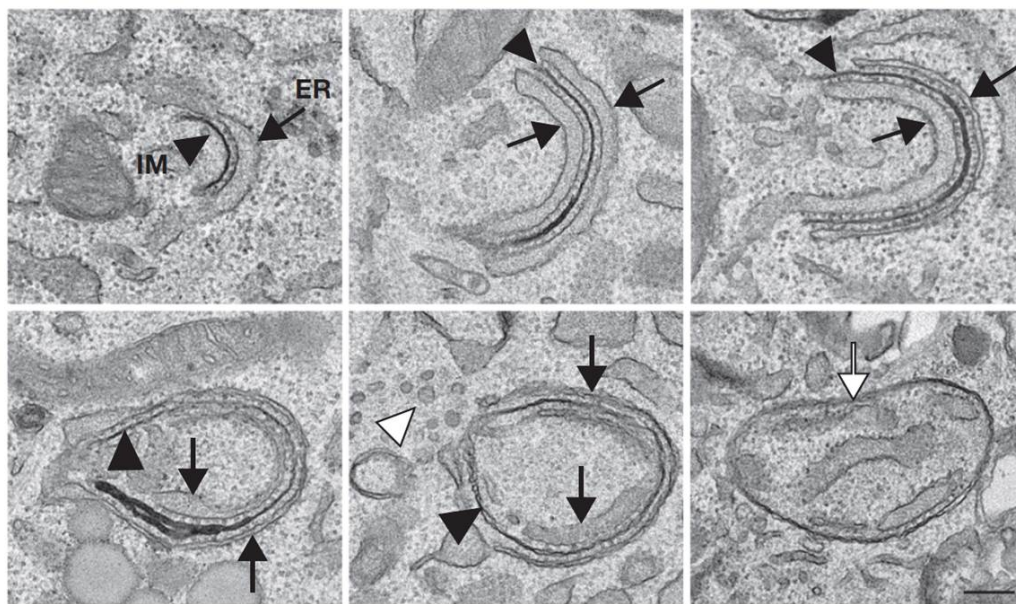


FIGURE 2.8: **PA moulé dans l'ER.** Photo au microscope électronique du PA (pointé par les triangles noirs) noté ici IM pour isolated membrane et de l'ER (flèche noire) de cellules MIH 3T3. Les triangles blancs indiquent des amas de vésicules proche du PA et la flèche blanche l'autophagosome (photo en bas à droite). Barre d'échelle : 200 nm. Extrait de [47].

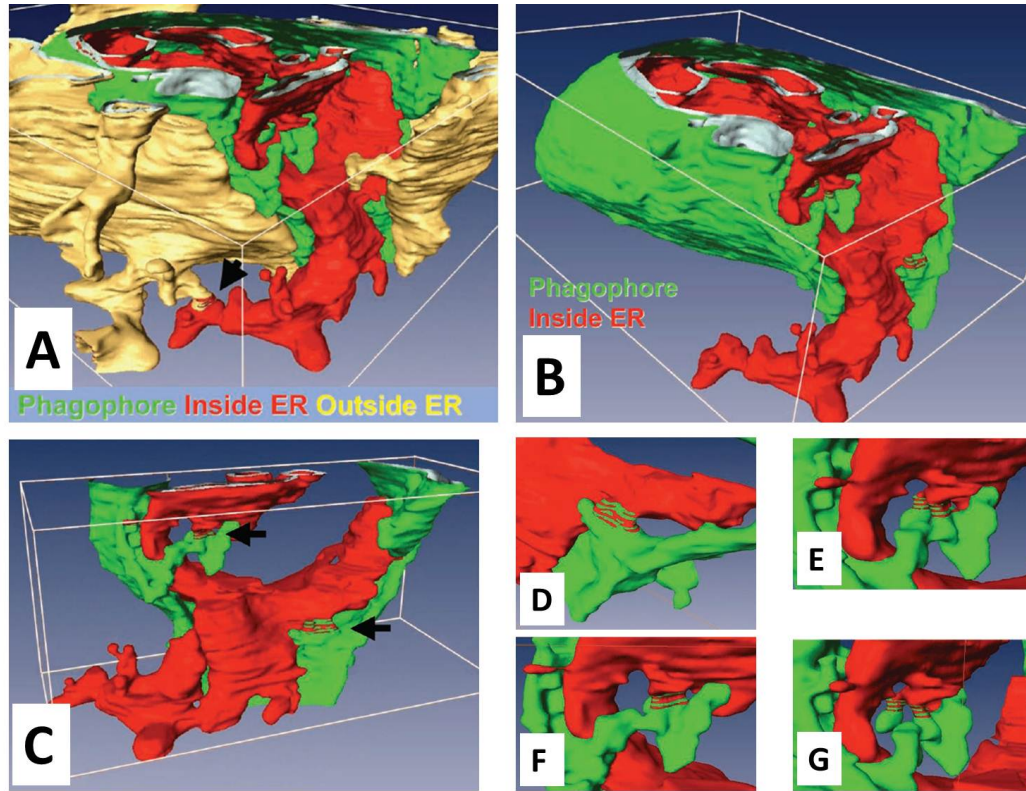


FIGURE 2.9: **Tomographie 3D du PA croissant à l'intérieur d'un moule formé par l'ER.** Les images (A – C) montrent le PA entier et les flèches noires indiquent les grossissements qui correspondent aux images (D - G). Les images (D - G) montrent des grossissements des connexions du PA avec l'ER. Extrait de [48].

La croissance de l'autophagosome a aussi été étudiée théoriquement à travers des modèles qui prennent en compte les caractéristiques physiques de sa membrane. Le modèle proposé par Knorr [49] montre qu'un disque de membrane formé d'une double bicouche se referme pour former une vésicule à double membranes dans certaines conditions (Fig. 2.10).

Le disque de membrane est caractérisé par son rayon r_{sheet} , et par le rayon de courbure de la membrane aux bords du disque r_{rim} (Fig. 2.11). Selon la valeur du rapport $r_{\text{sheet}} / r_{\text{rim}}$, il peut être énergétiquement accessible et plus favorable que le disque se courbe et forme une vésicule à double membrane (voir les détails des calculs dans [49] (Fig. 2.12).

Ce modèle montre donc que l'évolution de la morphologie de l'autophagosome peut s'expliquer en considérant les caractéristiques physiques de la membrane.

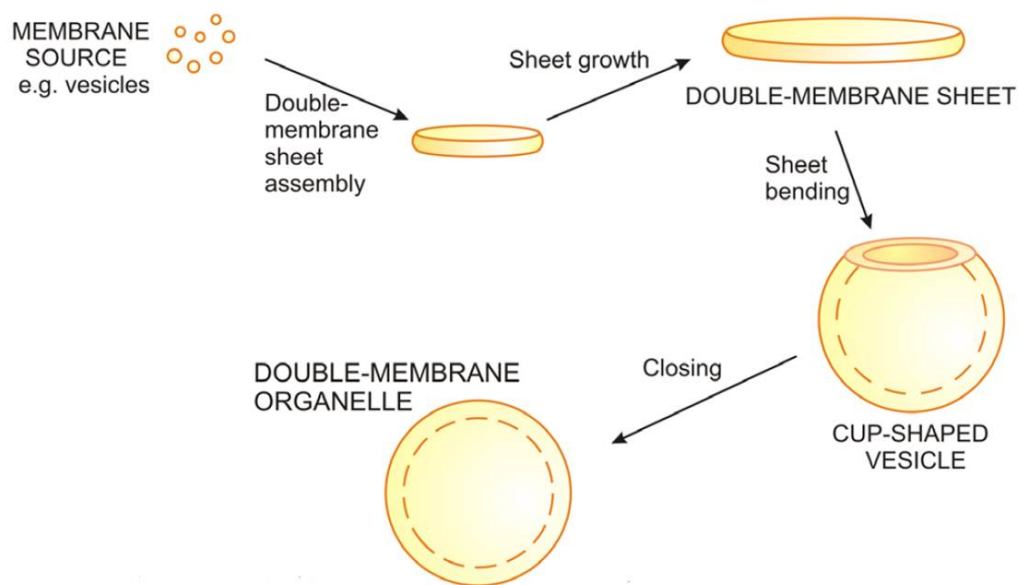


FIGURE 2.10: Schéma de la croissance d'une organelle à double membrane selon le modèle proposé par Knorr. Extrait de [49].

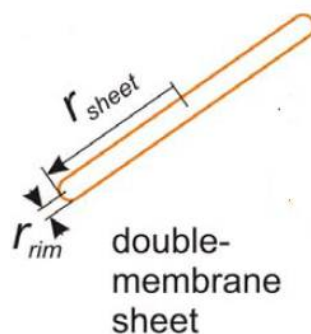


FIGURE 2.11: Schéma du disque de membrane formé d'une double bicouche. Extrait de [49].

Toutefois, ce modèle ne semble pas complètement validé par les observations expérimentales, puisque le knock out des protéines Atg8 par exemple révèle une présence anormalement élevée d'autophagosomes ouverts dans le cytosol [50, 51]. La croissance de l'autophagosome est donc aussi liée à une machinerie protéique qui module la forme de sa membrane.

Les observations faites en tomographie 3D des PAs au niveau de l'ER étaient réalisées sur des cellules dont l'autophagie avait été induite par déplétion de nutriments [48], il s'agissait donc d'une autophagie non sélective. Des études sur l'autophagie sélective montrent que le PA croît directement sur les molécules à

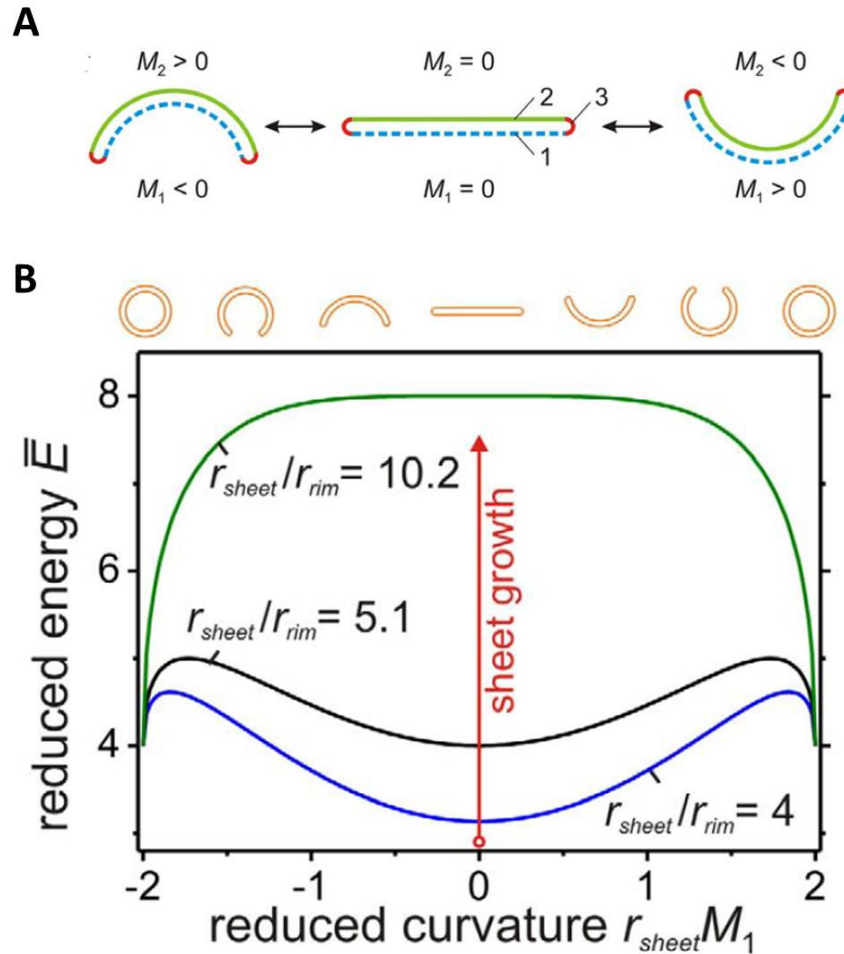


FIGURE 2.12: **Energie du disque membranaire selon sa courbure.** (A) Schéma en coupe du disque à double membrane. Trois segments de membrane sont distingués; le segment bas (ligne bleue pointillée), le segment haut (ligne verte), et les bords très courbés (rouge). Le feuillet est représenté dans trois configurations différentes; plate la courbure de chaque segment est égal à 0 ($M_1 = M_2 = 0$), courbure positive du segment 2 (gauche, $M_2 > 0$) et courbure positive du segment 1 (droite, $M_1 > 0$). (B) Le graphique montre l'énergie de courbure du disque (exprimée en une énergie de courbure réduite voir [49]) en fonction de $r_{sheet} M_1$ appelé courbure réduite, pour différent rapport r_{sheet} / r_{rim} . Lorsque la valeur du rapport augmente, la barrière énergétique entre une configuration plate de la membrane et une configuration courbée diminue. Extrait de [49].

dégrader probablement dans le but de limiter la destruction inutile d'une partie du cytosol. Prenons comme exemple un type d'autophagie sélective chez la levure, le cytoplasme-to-vacuole targeting pathway (Cvt), qui cible les protéases precursor aminopeptidase I (prApe1) présentes dans le cytosol pour les délivrer dans la vacuole (équivalent du lysosome chez la levure) [52]. Les protéines Atg19 ciblent les protéases prApe1 à dégrader et se fixent sur elles, une fois liées, les protéines Atg19 se lient aux protéines Atg8 ancrées sur des membranes isolées ce qui permet une apposition directe des membranes sur les protéases prApe1.

Nous venons de décrire trois études distinctes qui tendent à expliquer la morphologie de l'autophagosome lors de sa croissance. La première chose que nous pouvons remarquer est que les mécanismes décrits sont différents entre une autophagie sélective et non sélective. Il n'y a donc pas un seul mécanisme permettant la formation de l'autophagosome mais plusieurs et chacun d'eux ont lieu dans des conditions particulières, ce qui montre une capacité d'adaptation de l'autophagie à l'environnement. Un autre point important est les machineries protéiques qui interviennent lors de la formation de l'autophagosome. Dans le cas de l'autophagie sélective, elles permettent l'apposition directe des membranes isolées sur les molécules à dégrader. Nous savons aujourd'hui qu'il existe toute une famille de protéines qui intervient dans la formation de l'autophagosome, nous la décrirons dans la partie suivante 2.3. La croissance de l'autophagosome peut aussi être abordée via un autre aspect qui prend en considération les propriétés physiques de la membrane. Le modèle proposé par Knorr montre qu'un disque de membrane formé d'une double bicouche, ayant des caractéristiques en taille et courbure spécifique, tend à se refermer en une vésicule à double membrane pour optimiser son énergie. L'étude de la croissance de l'autophagosome doit donc prendre en compte les machineries protéiques qui agissent sur la membrane et les propriétés physiques de la membrane.

2.3 Les protéines impliquées dans l'autophagie

2.3.1 La famille de protéines Atg permet la formation de l'autophagosome

Dans le processus de l'autophagie, plus de 30 protéines interviennent [53]. Elles ont d'abord été identifiées chez *saccharomyces cerevisiae* [43] puis ont été regroupées en une famille de protéines sous le nom d'Atg provenant d'Autophagy [54–57]. Leurs orthologues chez les mammifères ont quasiment tous été identifiés et leur fonctionnement est similaire. Néanmoins, il existe des différences comme l'existence de plusieurs homologues chez les mammifères pour une protéine chez la levure, prenons comme exemple la protéine Atg16 chez la levure qui compte deux homologues chez les mammifères Atg16L1 et Atg16L2 ou bien la protéine Atg8 qui a six homologues chez les mammifères LC3 A/B/C et GABARAP/ GABARAPL1/GABARAPL2. L'étude de l'autophagie chez les mammifères est donc bien plus complexe, c'est pourquoi la plupart des recherches sur l'autophagie sont menées sur les levures. Les rôles de chacune des protéines Atg dans l'autophagie commencent à être compris grâce à des études *in vivo* et *in vitro* cependant dans le cas des mammifères on comprend assez rarement la différence entre chaque homologue [58].

La formation de l'autophagosome se décompose en plusieurs étapes (1) induction du PA, (2) nucléation du PA et (3) élongation et (4) fermeture du PA qui aboutit à la formation de l'autophagosome (Fig. 2.13) [24]. La reconnaissance des molécules à dégrader se fait sur les étapes (2) et (3). Il existe principalement trois groupes de protéines intervenant lors de la formation de l'autophagosome. En premier, le complexe Atg1/Ulk1, il est nécessaire à l'induction de l'autophagie. En second, les protéines Atg6/Beclin1 et Atg14, elles font partie du complexe phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et sont indispensables à la nucléation du PA. Enfin, les protéines Atg8 et Atg 12 sont nécessaires à l'élongation et la fermeture de l'autophagosome. Atg8 sera l'objet d'une description détaillée dans la partie suivante 2.3.2 car elle est le sujet d'étude de ce projet. A présent, à titre d'exemple nous allons décrire brièvement le fonctionnement du complexe Atg1/Ulk1 lors de l'induction de la formation du PA.

Dans une cellule ayant un apport suffisant en nutriment, la protéine Target of rapamycin (Tor) est synthétisée. Elle agit alors en phosphorylant la protéine Atg13 qui se dissocie du complexe protéique Atg1/Ulk1. L'activité du complexe Atg1/Ulk1

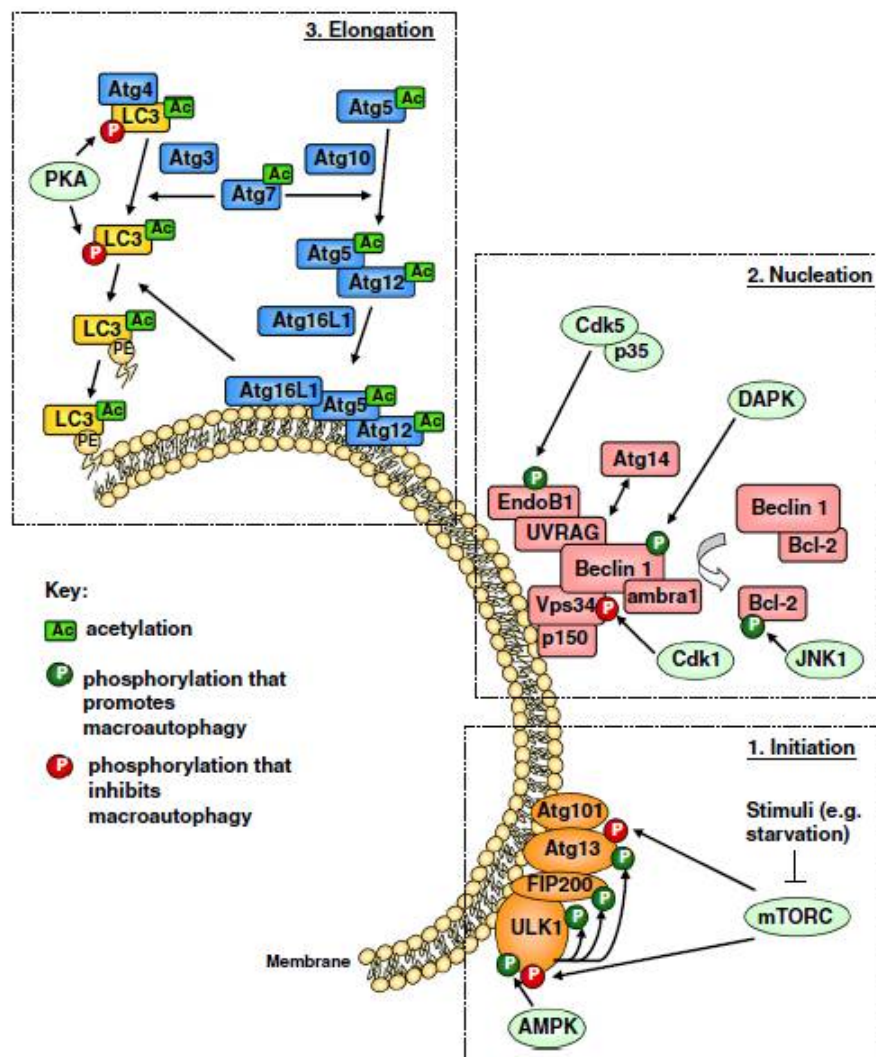


FIGURE 2.13: Schéma des mécanismes moléculaires régulant la formation de l'autophagosome chez les mammifères. Extrait de [24].

se trouve atténuée ce qui limite l'induction de l'autophagie. Dans le cas d'une déplétion de nutriment, la protéine Tor n'est pas synthétisée et le complexe Atg13-Atg1/Ulk1 induit fortement l'autophagie en se relocalisant du cytosol vers les membranes isolées constituant le futur PA [59]. Chez les mammifères, le complexe Atg1/Ulk1 peut se relocaliser sur certains domaines de l'ER qui potentiellement donnent naissance à un PA [58, 60].

2.3.2 Les protéines Atg8/LC3 marqueurs de l'autophagosome

La protéine Atg8 compte six homologues chez les mammifères LC3 A/B/C et GABARAP/ GABARAPL1 (GL1) /GABARAPL2 (GL2) ou GATE16 [58]. Cette famille de protéine est nommée Atg8/LC3. Elles sont les seules protéines à s'ancrer sur la membrane de l'autophagosome via un lien covalent et à rester liées à la membrane jusqu'à la destruction de l'autophagosome par le lysosome [61], contrairement aux autres protéines qui ne s'y lient que de façon transitoire. De plus, les protéines Atg8/LC3 ne se lient qu'à la membrane de l'autophagosome alors que les autres protéines peuvent se trouver sur d'autres membranes. La famille de protéines Atg8/LC3 est donc considérée comme le marqueur de l'autophagosome [62]. Le marquage de cette protéine en fluorescence permet de suivre la formation des autophagosomes *in vivo* comme nous l'avons vu dans l'expérience menée par Axe dans la partie 2.2.2 [44]. Dans des conditions nutritives normales, Atg8 est soluble dans le cytosol et elle se visualise comme un fond fluorescent diffus dans la cellule (Fig. 2.4), en cas de déplétion de nutriment, la protéine se localise sur les autophagosomes et apparait en points fluorescents (Fig. 2.4).

Les protéines Atg8/LC3 jouent un rôle clef dans l'élongation et la fermeture de l'autophagosome. En effet, des études menées sur des levures montrent que les autophagosomes formés sont anormalement petits si l'expression de la protéine Atg8 est bloquée [62, 63]. Cette protéine jouerait donc un rôle dans l'expansion de l'autophagosome. D'autres études réalisées sur des cellules de mammifère montrent qu'une déplétion des protéines Atg8/LC3 entraîne une augmentation du nombre d'autophagosomes ouverts (Fig. 2.14) [50, 51]. La protéine Atg8/LC3 joue donc probablement aussi un rôle dans la fermeture de l'autophagosome.

Dans la partie précédente 2.2.3 portant sur la morphologie du PA en formation, nous avons vu que des machineries protéiques étaient nécessaires pour moduler la forme de la membrane. Il semblerait que les protéines Atg8/LC3 soient des candidats potentiels puisqu'elles sont ancrées sur la membrane de l'autophagosome durant toute sa formation et qu'une déplétion de la protéine dans une cellule affecte la croissance des autophagosomes. Notre étude portera donc sur les protéines Atg8/LC3 et plus particulièrement sur la protéine GL1 car c'est un homologue chez les mammifères peu étudié à ce jour. De plus, la purification de cette protéine

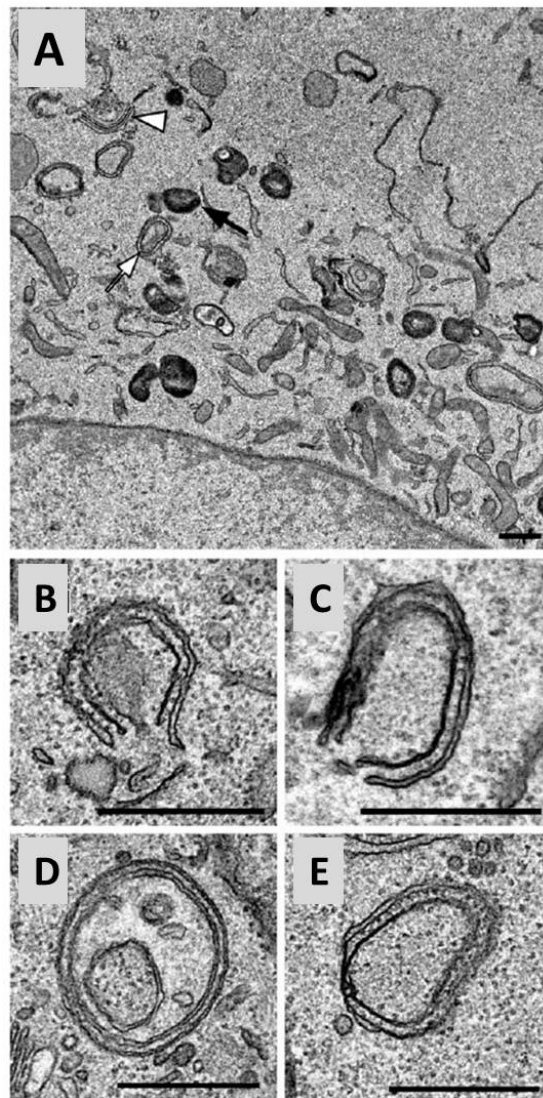


FIGURE 2.14: Cellules NIH 3T3 ayant subi une déplétion de la protéine **Atg8/LC3** photographiées au microscope électronique. (A) Photo du cytosol de la cellule, un exemple d'autophagosome ouvert est indiqué par une tête de flèche blanche et un autophagosome fermé par une flèche blanche. Les images (B – C) montrent des autophagosomes ouverts et les images (D – E) des autophagosomes fermés. Barre d'échelle : 500 nm. Extrait de [51].

est parfaitement maîtrisée par le laboratoire de Thomas Melia ce qui représente un avantage expérimental.

2.3.3 Structure des protéines Atg8/LC3

Les structures tridimensionnelles des protéines Atg8/LC3 sont similaires [64–67]. Elles sont constituées d'un corps ubiquitine et de deux hélices α au N-terminal. Nous allons décrire précisément la structure tridimensionnelle de la protéine GABARAP.

La structure de GABARAP est composée de deux domaines, un domaine C-terminal (résidus 27-117) et un petit domaine N-terminal (résidus 1-26). Le domaine C-terminal est composé de quatre feuillets β centraux et de deux hélices α , il présente donc des similarités structurales avec les ubiquitines, ce qui vaut l'appellation d'"ubiquitin-like protein" aux protéines Atg8/LC3. Le domaine N-terminal est constitué de deux hélices α qui peuvent adopter deux conformations ; l'hélice α à l'extrémité du N-terminal peut pivoter de presque 180 °C d'une conformation dite fermée (Fig. 2.15.A) à une conformation ouverte (Fig. 2.15.B) [66]. Dans la conformation ouverte l'hélice α au N-terminal peut s'apparier un niveau du domaine C-terminal d'une protéine GABARAP voisine (Fig. 2.15.C). Cette association fut observée en solution pour des concentrations en sel élevées. Néanmoins, nous pouvons supposer qu'elles peuvent avoir lieu dans des conditions naturelles, en étant ancrée sur une membrane par exemple. La protéine GABARAP présente donc un fort potentiel à l'oligomérisation.

La conformation dite ouverte de la protéine GABARAP n'a pas été observée sur les protéines homologues. Il est donc possible qu'elle soit propre à cette protéine mais aussi qu'elle soit fortement instable et n'existe que dans des conditions particulières. Elle pourrait s'induire à la suite de l'ancrage de la protéine dans la membrane ou bien en interagissant avec d'autres protéines.

2.3.4 Lipidation de la protéine Atg8/LC3 sur la membrane

La protéine GL1 s'ancore sur la membrane via une réaction de lipidation très similaire à une réaction ubiquitine. Les protéines sont d'abord synthétisées avec une lysine (K117) au C-terminal qui masque la glycine réactive (G116). La protéase

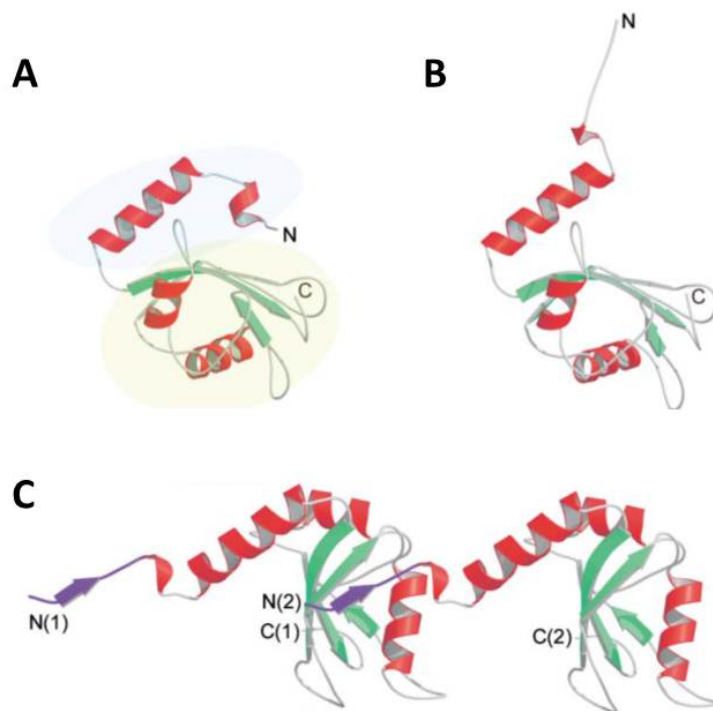


FIGURE 2.15: **Structure de la protéine GABARAP.** Diagramme ruban de la protéine GABARAP dans une conformation fermée (**A**) et une conformation ouverte (**B**). Les hélices α sont colorées en rouge et les feuillets β en vert. La représentation (**C**) montre l'appariement de deux GABARAP en conformation ouverte, le domaine N-terminal est coloré en violet. Extrait de [66].

Atg4 clive ce dernier résidu afin d'activer G116. Il en est de même pour les autres protéines de la famille Atg8/LC3, les sites de clivage étant légèrement différents (Fig. 2.16). Alors, la cystéine réactive de l'enzyme E1 (Atg7) forme un lien sulfhydrile covalent avec G116 d'une façon ATP dépendante. L'énergie de ce lien est ensuite utilisée pour transférer la protéine GL1 sur la cystéine réactive de l'enzyme E2 (Atg3). Enfin, la protéine Atg3 permet de rapprocher GL1 d'une amine libre (lysine) et permet la formation d'un lien covalent entre ce dernier et le résidu G116. Dans le cas d'une réaction ubiquitine classique l'amine est portée par une protéine, en revanche, ici elle se trouve sur la tête d'un lipide PE (Fig. 2.17) [68]. La protéine GL1 est donc une protéine périphérique. Elle peut être détachée du lipide PE par la protéase Atg4 qui reclive la séquence d'acides aminés après le résidu G116 ce qui permet à GL1 de conserver son activité.

Le rendement de la réaction ubiquitine peut être amélioré par la présence d'une enzyme E3. Dans le cas de la réaction de lipidation de GL1, l'enzyme E3 est le complexe protéique Atg5-12/16. Atg5 et Atg12 sont liés de façon covalente via une deuxième réaction ubiquitine. L'enzyme Atg7 active la protéine Atg12

Atg8

10	20	30	40	50	60
MKSTFKSEYP FEKKAESER IADRFKNRIP VICEKAESD IPEIDKRKYL VPADLTVGQF					
70	80	90	100	110	
VYVIRKRIML PPEKAIFIV NDTLPPTAAL MSAIQEHKD KDGFLYVTYS GENTFGR					

LC3 A

10	20	30	40	50	60
MPSDRPFKQR RSFADRCKEV QQIRDQHPSK IPVIIERYKG EKQLPVLDTK KFLVPDHSVNM					
70	80	90	100	110	120
SELVKIIRRR LQLNPTQAFF LLVNQHSMSV VSTPIADIYE QEKDEDGFLY MVIASQETFG F					

LC3 B

10	20	30	40	50	60
MPSEKTFKQR RTFEQRVEDV RLIREQHPTK IPVIIERYKG EKQLPVLDTK KFLVPDHSVNM					
70	80	90	100	110	120
SELIKIIRRR LQLNANQAFF LLVNGHSMVS VSTPISEVYE SEKDEDGFLY MVIASQETFG MKLSV					

LC3 C

10	20	30	40	50	60	70
MPPQKIPSV RPFKQRKSLA IRQEEVAGIR AKFPNKIPVV VERYPRETFL PPLDKTKFLV PQELTMTQFL						
80	90	100	110	120	130	140
SIIRSRMVL R ATEAFYLLVN NKSLVMSMSAT MAEIYRDYKD EDGFVYMTYA SQETFGCLES AAPRDGSSLE DRPCNPL						

GABARAP

10	20	30	40	50	60
MKFVYKEEHP FEKRRSEGEK IRKKYPDRVP VIVEKAPKAR IGDLDKKKYL VPSDLTVGQF					
70	80	90	100	110	
YFLIRKRIHL RAEDALFFV NNVIPPTSAT MGQLYQEHHE EDFFLYIAYS DESVYGL					

GABARAPL1

10	20	30	40	50	60
MKFQYKEDHP FEYRKKEGEK IRKKYPDRVP VIVEKAPKAR VPDLDKRKYL VPSDLTVGQF					
70	80	90	100	110	
YFLIRKRIHL RPEDALFFV NNTIPPTSAT MGQLYEDNHE EDYFLYVAYS DESVYGK					

GABARAPL2/Gate16

10	20	30	40	50	60
MKWMFKEDHS LEHRCVESAK IRAKYPDRVP VIVEKVSQSQ IVDIDKRKYL VPSDITVAQF					
70	80	90	100	110	
MWIIRKRIQL PSEKAIFLV DKTVPQSSLT MGQLYEKED EDGFLYVAYS GENTFGF					

FIGURE 2.16: **Structures primaires des protéines Atg8/LC3.** Le site de clivage de la protéase Atg4 se situe après la glycine colorée en rouge.

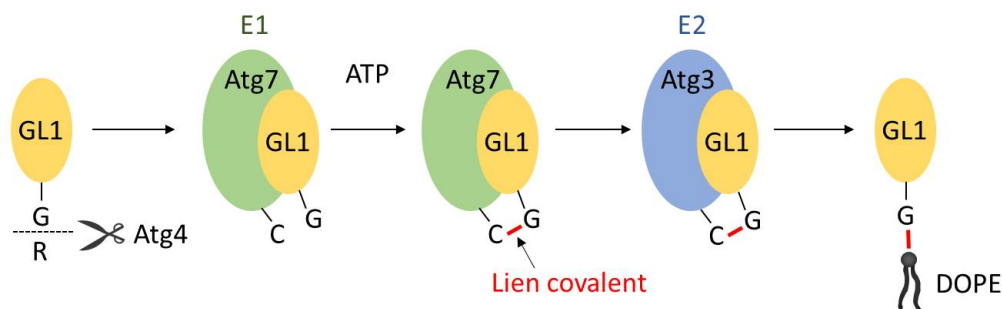


FIGURE 2.17: **Réaction de lipidation de la protéine GL1**

semblable à une protéine ubiquitine puis la transfère à l'enzyme Atg10. Enfin, Atg10 lie de façon covalente la glycine au C-terminal d'Atg12 à la lysine (K149) d'Atg5 [59]. La protéine Atg16 se conjugue de façon non covalente à Atg5-12 pour former le complexe Atg5-12/16. Cette enzyme E3 favorise le transfert de GL1 de l'enzyme Atg3 au lipide PE (Fig. 2.18). In vitro, l'enzyme E3 permet d'améliorer le rendement de lipidation de GL1, en revanche in vivo la présence de ce complexe est indispensable [69]. La protéine Atg8 a déjà été reconstituée avec les enzymes E1, E2 et E3 sur la membrane de GUVs. Alors que les enzymes Atg3 et Atg7 quittent la membrane après le recrutement de GL1, le complexe Atg5-12/16 reste sur la membrane et forme un ensemble qui immobilise la protéine Atg8 sur la membrane [70]. Au cours de ce projet, nous voulons étudier le comportement de GL1 sur la membrane indépendamment de toutes autres protéines, nous n'utiliserons donc pas le complexe protéique Atg5-12/16.

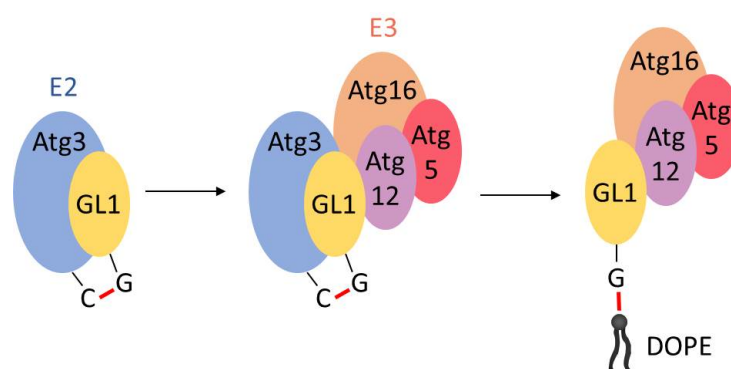


FIGURE 2.18: Réaction de lipidation de la protéine GL1 avec le complexe protéique Atg5-12/16.

2.3.5 Ancrage d'Atg3 dans la membrane

L'enzyme Atg3 se lie de façon transitoire à la membrane afin de recruter la protéine GL1 sur un lipide PE. L'ancrage d'Atg3 se fait via son hélice amphiphile qui cible les défauts à la surface de la bicouche (voir 1.3.2). La présence de ces défauts varie selon les caractéristiques de la membrane comme cela a été vu dans la partie 1.2.4. La reconstitution in vitro de la protéine GL1 avec les enzymes Atg7 et Atg3 dans des petits liposomes montre un rendement très variable selon la taille des liposomes et la concentration en lipides PE dans la bicouche. Pour des liposomes d'environ 400 nm de diamètre, la concentration en lipides PE permettant une

bonne incorporation de GL1 était de 55% (Fig. 2.19.A). Pour une faible concentration en lipides PE dans la membrane (<30%), une bonne lipitation de GL1 était obtenue sur des liposomes de diamètre 50 nm (Fig. 2.19.B). La lipitation de la protéine GL1 est donc modulée par l'hélice amphiphile de la protéine Atg3 et les propriétés de la membrane (Fig. 2.19.C)[13]. Et puisque la concentration physiologique en lipides PE dans les membranes biologiques est d'environ 20% (Fig. 2.6 et Fig. 2.7), il semblerait donc qu'in vivo la protéine GL1 s'ancre préférentiellement sur les membranes courbées comme les bords les bords de l'autophagosome en formation.

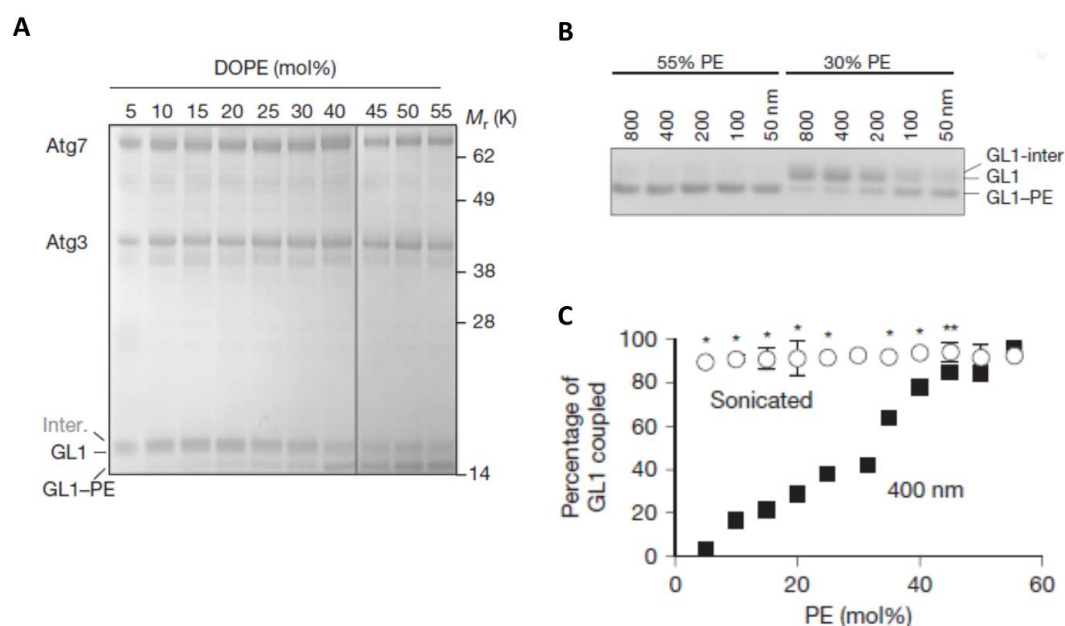


FIGURE 2.19: **Reconstitution de la protéine GL1 sur des petits liposomes.** (A) La réaction de lipitation est réalisée sur des liposomes de 400 nm de diamètre de la composition suivante : DOPE (concentration molaire indiquée sur le gel), 10 mol % bI-PI, 0.15 mol % Rh-DOPE et POPC. (B) La réaction de lipitation est réalisée sur des liposomes de diamètre compris entre 800 nm et 50 nm et pour deux compositions différentes 55 mol % et 30 mol % de lipide PE, le reste de la composition est identique à celle décrite dans (A). (C) Graphique du pourcentage de protéines GL1 lipidées en fonction de la concentration en lipide PE dans la membrane pour deux tailles de liposomes 400 nm de diamètre (carré noir) et 50 nm de diamètre (sonicated, rond blanc). La reste de la composition lipidique de la membrane est identique à (A) et (B). Extrait de [13].



Chapitre 3

Incorporation de GL1 dans des modèles membranaires

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que la formation de l'autophagosome résultait de l'intervention de machineries protéiques sur la membrane du PA et des caractéristiques physique de la membrane du PA. C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier les interactions de la machinerie protéique liée à la protéine GL1, l'unique marqueur de l'autophagosome, avec des membranes. Pour cela, nous utiliserons des membranes modèles dont nous contrôlerons les propriétés physiques et dans lesquelles nous reconstituerons la protéine GL1.

Dans ce chapitre, nous expliquerons notre choix de modèle membranaire pour servir de substrat à la protéine GL1. Puis, nous présenterons les deux stratégies de lipidation permettant la reconstitution de la protéine GL1 dans les membranes modèles. Ensuite, nous détaillerons une étude menée sur la reconstitution de la protéine GL1 dans des petits liposomes de composition lipidique variable. Enfin, nous exposerons les rôles de la protéine GL1 connus à ce jour et découverts grâce à l'utilisation de membranes modèles.

3.1 Choix des modèles membranaires servant de substrat à la protéine GL1

L'autophagosome est une vésicule à double membrane et lors de sa formation il ressemble à une vésicule dégonflée (voir [2.2](#)). Peu de choses sont aujourd'hui connues

sur sa composition et ses origines comme nous l'avons vu dans la partie 2.2.2, en revanche la morphologie de sa membrane lors de sa croissance a pu être étudiée grâce au microscope électronique et à la tomographie 3D (voir 2.2.3). Nous savons donc que la membrane du PA présente des zones de morphologie très différentes, la membrane étant beaucoup plus courbée sur les bords du PA que sur le reste de sa surface. En choisissant comme modèle membranaire des liposomes de petites tailles (50 nm – 400 nm) et des GUVs (20 μ m), nous avons pu étudier l'influence de la courbure de la membrane sur l'ancrage de la protéine GL1. L'utilisation de GUVs présentait un autre avantage majeur, elle permettait l'étude de la dynamique de la protéine GL1 sur la membrane (voir chapitre 5). La dynamique de la protéine pouvant elle-même nous renseigner sur son état d'oligomérisation. Les GUVs sont aussi micromanipulables, ce qui nous a permis de tirer des tubes de membranes de faibles rayons à partir des GUVs (voir 1.5.5 et chapitre 7) et ainsi étudier la distribution et la dynamique de la protéine sur une unique membrane présentant plusieurs courbures.

En utilisant, des GUVs, nous pouvons donc mimer certaines caractéristiques morphologiques de la membrane du PA. Cependant, ce modèle comporte des limites et notamment au niveau de la tension de sa membrane. Lorsqu'une GUV est micromanipulée une certaine tension s'exerce sur sa membrane comme en témoigne la langue projetée dans la micropipette (voir 1.5.1), en revanche la tension de la membrane du PA est quasiment nulle puisqu'il est une vésicule dégonflée. Nous savons que la tension de la membrane influence peu la dynamique d'un objet ancré dans la membrane, nous pouvons donc supposer que les études de la distribution et de la dynamique de GL1 sur les GUVs sont représentatives de la dynamique de GL1 sur la membrane du PA.

Bien que la composition du PA soit inconnue, l'utilisation de petits liposomes et des GUVs impliquait un choix de composition lipidique pour les membranes. Nous avons donc choisi des compositions permettant un bon ancrage de la protéine GL1 et cohérentes avec des études sur le lipidome (voir 2.2.2) [2, 13, 46]. Les membranes seront donc composées de lipides PE, PC, PS et cholestérol, les chaînes des phospholipides pouvant être saturées ou insaturées (Fig. 3.1). Nous utiliserons souvent des lipides fluorescents qui nous permettront de visualiser la membrane des GUVs en fluorescence (Fig. 3.1). Pour certaines expériences, nous aurons recours à des lipides dont la tête a été fonctionnalisée : DOPE- maléimide (chapitres 4, 5 et 6) et DSPE-biotine (chapitre 7) (Fig. 3.1).

Lipides	Lipides fluorescents
DOPC 18: 1 18:1	DOPE-NBD
POPC 16: 0 18: 1	DOPE-Rhodamine
DPPC 16: 0 16: 0	DHPE-TexasRed
DOPS 18: 1 18: 1	DHPE-OregonGreen
POPS 16: 0 18: 1	DOPE-ATTO647
DOPE 18: 1 18: 1	DOPE-ATTO488
DPPE 16: 0 16: 0	
DMPE 14: 0 14: 0	Lipides fonctionnalisés
Cholestérol	DOPE-maléimide
	DSPE-biotine

FIGURE 3.1: **Liste des lipides utilisés pour ce projet.** La longueur et le nombre d'insaturation des chaînes hydrophobes sont indiqués à droite du nom du lipide.

Dans les chapitres 4 et 5, nous étudierons l'ancrage, la répartition et la dynamique de la protéine GL1 sur des liposomes et des GUVs pour des compositions membranaires différentes. Nous choisirons notamment des compositions lipidiques permettant la formation de microdomaines et nous étudierons leur influence sur la répartition et la dynamique de GL1. A ce jour, il n'y a aucune certitude sur la présence de domaines lipidiques (rafts) sur la membrane de l'autophagosome néanmoins ils ont été observés sur des membranes cellulaires et jouent un rôle biologiques (voir 1.2.3). Nous faisons donc l'hypothèse de leur existence et la phase liquide ordonnée des GUVs servira de modèle à des rafts potentiels. La pertinence biologique de ce modèle peut être remise en question, car aujourd'hui peu de choses sont connues sur les rafts. Leur origine, leur composition et leur taille sont mal connues, nous ne savons donc pas si les domaines présents sur des GUVs peuvent constituer un bon modèle. Néanmoins, ils constituent aujourd'hui l'approche la plus classique et la plus simple à l'étude des interactions entre les protéines et les domaines lipidiques.

3.2 Les deux stratégies de lipidation de la protéine GL1 sur des liposomes

Les protéines utilisées dans ce projet ont été exprimées puis purifiées dans une bactérie [71] par le laboratoire de Thomas Melia, un protocole détaillé se trouve dans l'article de Jotwani [68]. Nous avons utilisé deux stratégies de lipidation pour reconstituer la protéine GL1 dans la membrane de liposomes. La première stratégie mime la réaction ubiquitine qui a lieu *in vivo* et la seconde nécessite une protéine GL1 mutante qui s'ancre sur la membrane sans l'intervention d'enzyme.

La réaction ubiquitine de lipidation de GL1 *in vivo* recourant aux enzymes Atg3 et Atg7 peut être reproduite *in vitro* sur des petits liposomes. *In vivo*, la protéine GL1 doit être tronquée au niveau de son C-terminal pour être activée, *in vitro* elle est directement purifiée avec la glycine réactive (G116) exposée et prête à interagir avec Atg3 et Atg7 (voir 2.3.4). La protéine GL1 lipidée forme un lien covalent entre sa glycine G116 et une amine présente sur la tête d'un lipide PE (Fig. 3.2.A) de la même façon qu'*in vivo*. Afin de visualiser la protéine en fluorescence, GL1 est mutée au niveau de son N-terminal pour inclure une cystéine qui se lie au marqueur Alexa488 C5 maléimide via un lien sulfhydrile (Fig. 3.2.B) (annexe B). A la suite de la réaction de marquage environ 1 protéine sur 20 est liée à un fluorophore, nous nommerons par la suite ce mélange de protéines marquées et non marquées GL1^{G116} (Fig. 3.3.A). Nous supposons que le faible taux de marquage peut être dû à la structure globulaire de la protéine qui rend la cystéine ajoutée au N-terminal peu accessible et limite donc la réaction de marquage.

Dans la seconde stratégie de lipidation, GL1 se lie à la membrane sans l'intervention d'enzyme. La protéine est exprimée avec une cystéine au C-terminal à la place de la glycine et afin de visualiser la protéine en fluorescence une YFP est ajoutée au N-terminal, nous nommerons cette protéine GL1^{G116C} dans le reste du texte. La cystéine au C-terminal peut se lier covalamment via un lien sulfhydrile au groupe maléimide accroché sur la tête d'un lipide (Fig. 3.3.B). Cette stratégie de lipidation a l'avantage de mimer la réaction naturelle avec un besoin moindre en protéines (Fig. 3.3.C). De plus, toutes les fonctions de la protéine GL1 découvertes à ce jour sont conservées chez le mutant, il constitue donc un système mimétique valable. Les fonctions de la protéine GL1 seront détaillées à la fin de ce chapitre (voir 3.4).

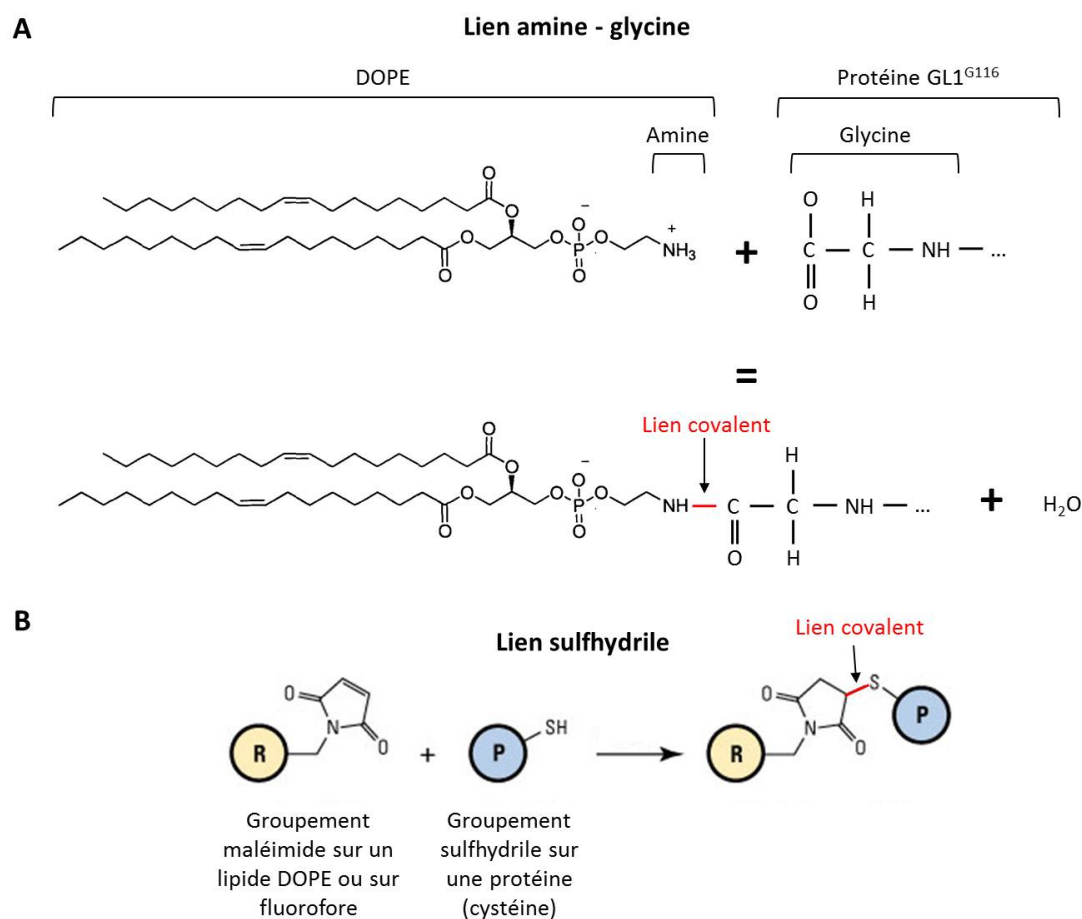


FIGURE 3.2: Schéma des réactions amine - glycine (A) et sulfhydrile (B). Extrait de <https://www.lifetechnologies.com> et de <http://www.avantilipids.com/>.

3.3 Incorporation de GL1 dans des petits liposomes

3.3.1 Les réactions de lipidation

Les deux protéines GL1 décrites dans la partie précédente GL1^{G116} et GL1^{G116C} constituent deux stratégies de lipidation. Elles ont toutes deux été explorées pour l'incorporation de GL1 dans des petits liposomes (fabrication détaillée en annexe A). Les protocoles de lipidation détaillés sont donnés dans les annexes C et D, ici nous nous appliquerons à les décrire brièvement et à développer les difficultés survenues ainsi que les moyens utilisés pour les contourner.

La réaction ubiquitine permettant la formation d'un lien covalent entre un lipide PE et la protéine GL1^{G116}, implique deux enzymes spécifiques à l'autophagie Atg3

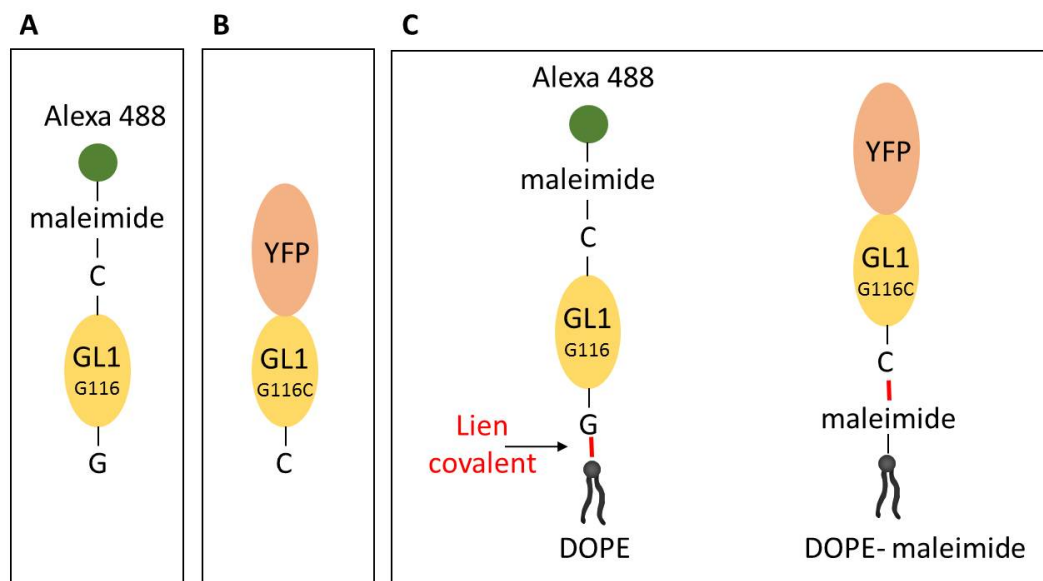


FIGURE 3.3: Schéma des protéines GL1^{G116} (A) et GL1^{G116C} (B). (C) Schéma des protéines GL1^{G116} et GL1^{G116C} liées aux lipides.

et Atg7. Comme nous l'avons vu dans la partie (voir 1.3.2), l'ancrage de la protéine GL1^{G116} est régulé par l'hélice amphiphile de la protéine Atg3. Les conditions optimales de lipidation de GL1 sur des petits liposomes étaient vérifiées soit pour des liposomes composés au minimum de 55% de lipides DOPE, soit pour des liposomes de diamètre inférieur ou égal à 50 nm (Fig. 3.4). Or, nos liposomes d'études mesurent environ 400 nm de diamètre et sont composés de 30% de lipides PE, ils ne permettent donc pas une bonne incorporation de GL1^{G116} dans la membrane. En conséquence, afin de faciliter l'ancrage de GL1^{G116} dans la membrane, nous avons utilisé une protéine Atg3 mutante qui a une dépendance aux défauts présents sur la bicouche moindre. L'hélice amphiphile d'Atg3 s'insérant dans la membrane a été mutée pour augmenter son hydrophobicité, le résidu lysine 11 (K11) a été remplacé par un triptophane (W) très hydrophobe [13]. Ainsi, l'hélice amphiphile s'insère dans la membrane même si celle-ci présente peu ou pas de défauts à sa surface. L'Atg3 mutant sera nommé Atg3^{K11W} dans le reste du texte.

Un mélange dans des bonnes proportions de GL1^{G116}, d'Atg3^{K11W}, d'Atg7, d'ATP et de liposomes suivi d'une incubation à 37°C pendant 90 min conduit à l'ancrage de GL1^{G116} dans les membranes (annexe C). La réaction de lipidation peut être vérifiée sur gel (SDS-PAGE), GL1^{G116} et GL1^{G116}-PE ne migrant pas au même niveau. Dans le but de montrer que la protéine Atg3^{K11W} permet une meilleure lipidation de la protéine GL1^{G116} sur une membrane présentant peu de défauts,

deux réactions de lipidation ont été réalisées. Dans l'une la protéine Atg3 était utilisée dans l'autre la protéine Atg3^{K11W}, les autres paramètres étant identiques. Les liposomes utilisés mesuraient environ 400 nm de diamètre et étaient composés de DOPE 30%, DOPC 10 %, DPPC 40% et cholestérol 20% (Fig. 3.4). La première chose à noter est la position relative des bandes GL1^{G116} et GL1^{G116}-PE. Alors que GL1^{G116}-PE est plus lourde, elle migre plus loin, ceci est probablement dû à la présence du lipide qui réagit avec les molécules de SDS différemment d'avec les protéines. Les enzymes Atg3, Atg3^{K11W} et Atg7 ne sont pas visibles sur ce gel car elles migrent à des positions différentes de la protéine GL1^{G116} étant donné leur taille, 35 KDa pour les protéines Atg3 et Atg3^{K11W} et 77 KDa pour la protéine Atg7. En observant le rendement de la lipidation, nous constatons que l'utilisation de la protéine Atg3 ne permet qu'une très faible incorporation de la protéine GL1^{G116} alors que la protéine Atg3^{K11W} permet une lipidation quasi totale. Cette expérience montre bien une diminution de la sensibilité de la protéine Atg3^{K11W} aux défauts hydrophobes présents à la surface de la membrane.

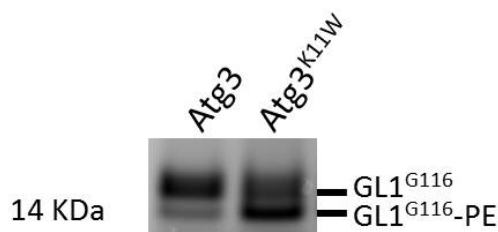


FIGURE 3.4: **Réaction de lipidation de la protéine GL1^{G116} en utilisant les enzymes Atg3 ou Atg3^{K11W}.** Les liposomes mesuraient 400 nm de diamètre et étaient composés de DOPE 30%, DOPC 10%, DPPC 40% et cholestérol 20%.

La réaction de lipidation de la protéine mutante GL1^{G116C} sur des liposomes contenant de 2 à 5% de lipide maléimide ne nécessite aucun autre composant que du TCEP qui limite l'association des cystéines entre elles (annexe D). En l'absence de la protéine Atg3, la taille des liposomes n'a plus d'importance, et comme nous le verrons dans la partie suivante 3.3.2, la lipidation peut être très efficace sur des liposomes mesurant 200 nm de diamètre.

3.3.2 Courte étude sur des GL1-PE liposomes

Les deux études suivantes vont confirmer la dépendance de la lipitation de GL1 à la composition de la membrane. Dans un premier cas nous avons analysé la dépendance de la concentration en PE sur la lipitation de la protéine GL1^{G116} puis l'influence du pH et de la concentration en PE sur l'ancrage de GL1^{G116C}.

La lipitation de la protéine GL1^{G116} est régulée par la protéine Atg3 qui s'ancree sur la membrane au niveau de défauts qui peuvent être dus à des lipides à formes coniques comme les lipides PE (voir 1.2.4). Nous allons donc tester la lipitation de GL1^{G116} sur des petits liposomes de 100 nm de diamètre contenant différentes concentrations en lipides DOPE : 0 %, 30 % et 55 % (complété par PI 10 % et de la POPC) en utilisant la protéine Atg3 non mutée. Lors de la réaction de lipitation, le rapport protéine sur lipides PE est de 1/100 pour les membranes composées de 30 % de PE et de 1/150 pour celles composées de 55 % de PE. Bien que le PE soit largement en excès dans les deux cas, la lipitation de GL1^{G116} est plus efficace sur les liposomes composés à 55 % de lipides PE (Fig. 3.5). Sur les liposomes ne contenant pas de lipides PE (contrôle négatif), la lipitation est nulle. Cette expérience confirme que les défauts à la surface de la membrane, engendrés en partie par la concentration en lipides PE, sont nécessaires au recrutement de GL1^{G116} par la protéine Atg3.

L'ancrage de la protéine GL1^{G116C} se fait sur un lipide maléimide, l'utilisation de ce lipide peut poser problème si la bicouche est riche en lipide PE. En effet, à un pH 8 et lorsque la concentration en lipides PE (30 - 55 %) est largement supérieure à la concentration en maléimide (5 %), la protéine ne se lie plus à la membrane (Fig. 3.6). Ce résultat peut se justifier de la façon suivante, la maléimide interagit avec des groupes amines que l'on trouve sur des lipides PE ou sulfhydryles situés sur les cystéines. La réaction de la maléimide avec les groupes sulfhydryles est environ 1000 fois plus rapide que celle avec les groupes amines, cette dernière réaction est donc en général négligeable. Cependant dans la configuration de cette expérience, la forte concentration en amines (lipide PE) à la surface de la bicouche rend la réaction amines dominante. Cet effet peut être contourné en abaissant le pH de la solution. Le passage d'un pH 8 à un pH 6,2 change la vitesse relative des deux réactions et augmente le rendement de la réaction sulfhydryle (Fig. 3.6).

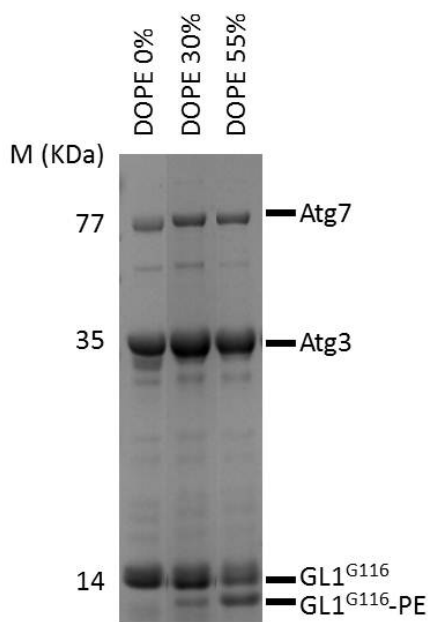


FIGURE 3.5: **Lipidation de la protéine GL1^{G116}**. Les liposomes mesuraient 100 nm de diamètre et étaient composés de : 0-55 mol% DOPE, 10 mol% PI et POPC.

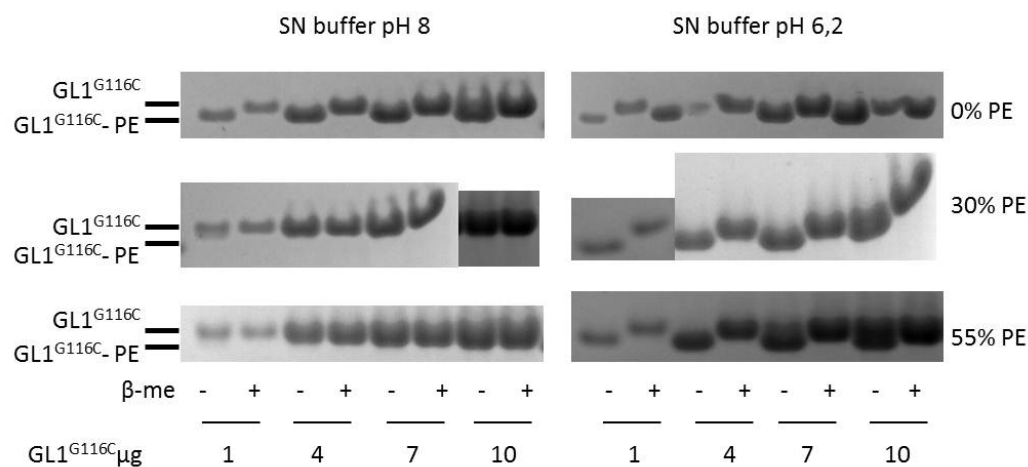


FIGURE 3.6: **Lipidation de la protéine GL1^{G116C}**. Les liposomes mesuraient 200 nm de diamètre et étaient composés de 0 - 55 mol% DOPE, 10 mol% PI, 5 mol% DOPE-maléimide et POPC. Les liposomes étaient préparés dans du buffer SN (50 mM trisHCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl²) à pH 8 ou 6,2. L'addition de β -mercaptoethanol à la réaction quénche les maléimides et empêche la liaison de GL1^{G116C}, ces réactions constituent des contrôles négatifs.

3.4 Aperçu des rôles GL1 connus à ce jour

Des expériences *in vivo* ont montré que GL1 jouait un rôle dans la formation du PA (voir 2.3.2). Afin de déterminer ses fonctions plus précisément, cette protéine fut reconstituée dans des petits liposomes et des GUVs [68, 72, 73]. Nous distinguerons deux principaux résultats donnés par ces études qui nous seront particulièrement utiles dans nos recherches ; GL1 permet l'adhésion des membranes et potentiellement leur fusion.

La reconstitution de GL1 dans des petits liposomes puis leur observation montrent une agrégation des liposomes au cours du temps qui est proportionnelle à la quantité de protéines GL1 incorporée dans les liposomes. Ce résultat fut mis en évidence par différentes méthodes expérimentales. En utilisant la microscopie de phase, des agrégats de liposomes Atg8-PE commencent à être visibles après dix minutes d'observation et grandissent au cours du temps, alors que des liposomes de composition identique sans protéine observés en parallèle ne forment aucun agrégat (Fig. 3.7) [72]. Ces résultats furent approfondis avec l'utilisation de la DLS (diffusion light scattering) qui mesure la taille des objets en solution par diffusion de lumière. Des petits liposomes Atg8-PE furent préparés avec différentes concentrations en protéines Atg8 sur leur membrane. Après un temps d'incubation de 60 min, les mesures à la DLS révèlent qu'en dessous d'une concentration d'Atg8 de 3 μ M, il y a peu de formation d'agrégats de liposomes Atg8-PE et qu'à partir de 3 μ M la taille des agrégats augmentent avec la concentration en Atg8 (Fig. 3.8) [72]. La présence d'Atg8 en concentration suffisante sur les membranes des liposomes est responsable de l'agrégation des liposomes et donc de l'adhésion de leur membrane. Ces résultats ont été confirmés pour les protéines homologues chez les mammifères [68, 74–76].

Les expériences précédentes nous ont montré que la protéine GL1 permet l'adhésion des membranes. Cependant aucune d'elles ne montrent si l'adhésion est due à une association de protéines GL1 sur les membranes apposées (interaction protéique homotypique) ou bien à l'interaction directe protéine lipide. En effet, il est impossible en travaillant avec des liposomes en solution de distinguer ces deux types d'interaction. Nous pouvons imaginer que la protéine GL1 dans sa conformation ouverte, si elle existe (voir 2.3.3, [66]), s'oligomériserait en trans via son hélice N-terminale ou bien s'ancrerait directement sur la membrane apposée via cette même hélice. L'observation d'agrégats de liposomes Atg8-PE au microscope électronique

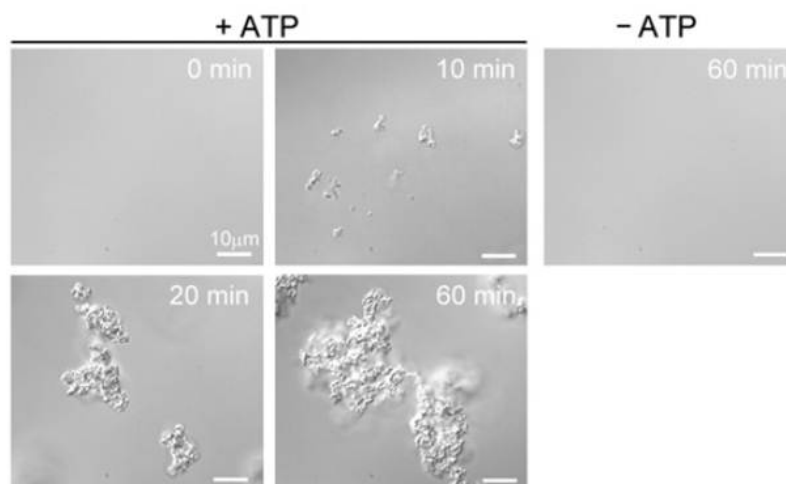


FIGURE 3.7: **Observation en microscopie de phase de liposomes Atg8-PE au cours du temps.** La réaction de lipidation est la suivante : Atg8 (10 μM), Atg7 (1 μM), Atg3 (1 μM), ATP (1 mM), liposomes (350 μM lipides). La composition lipidique des liposomes : 55 mol% DOPE, 30 mol% POPC et 15 mol% biPI. Un contrôle négatif a été réalisé en retirant l'ATP de la réaction de lipidation. Extrait de [72].

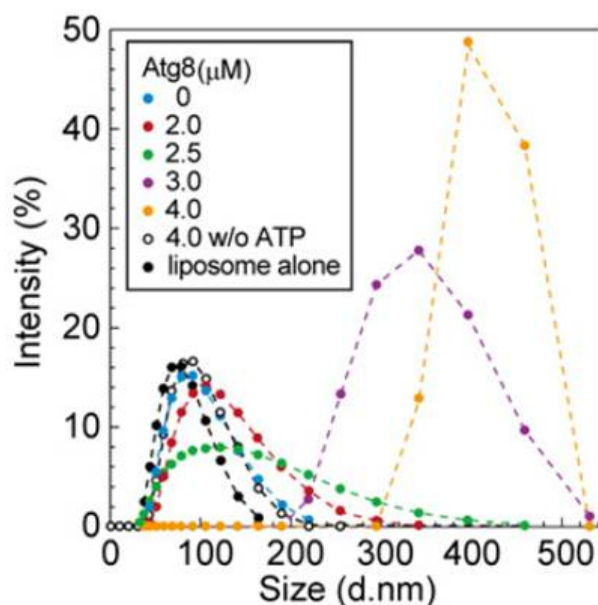


FIGURE 3.8: **Distribution de la taille des agrégats formés dans des solutions de liposomes Atg8-PE.** Les réactions de lipidation sont identiques à celle décrite dans la figure précédente à l'exception de la concentration en protéine Atg8 qui varie. Les solutions de liposomes Atg8-PE sont incubées 60 min avant l'observation à la DLS. Extrait de [72].

dont une fraction des protéines Atg8 était marquée avec des particules d'or de 5 nm (Fig. 3.9.A), semble montrer une interaction homotypique de la protéine avec un enrichissement au niveau de la zone de contact (Fig. 3.9.B) [72]. Cependant étant donné le faible marquage, ces résultats demandent à être confirmés.

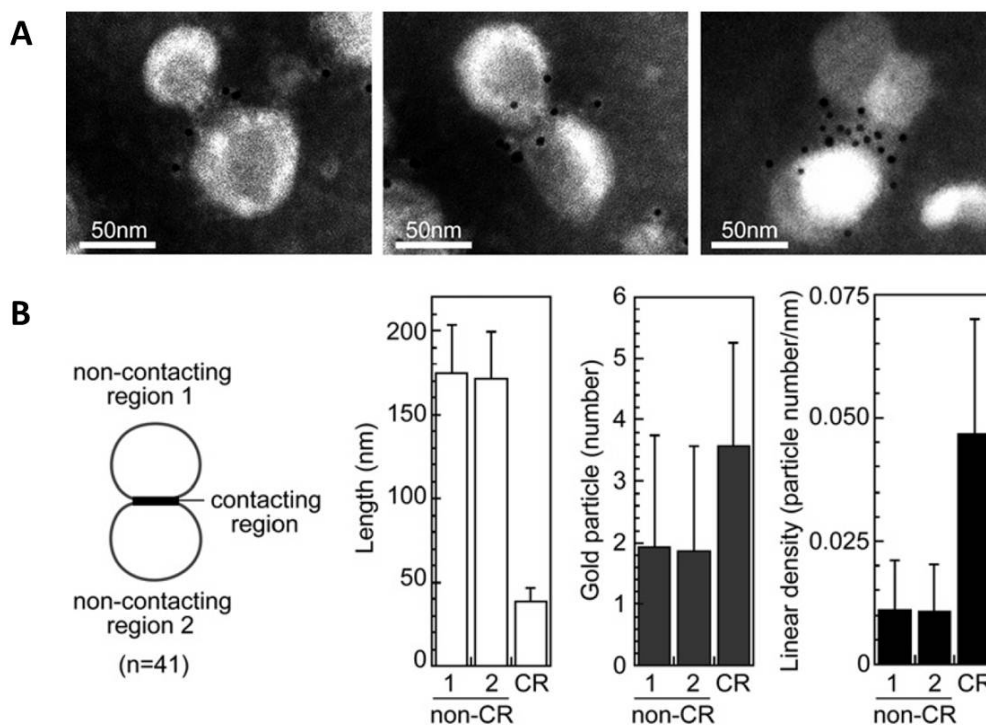


FIGURE 3.9: **Observation en microscopie électronique de liposomes Atg8-PE.**(A) Photo au microscope électronique de liposome Atg8-PE agrégés. La réaction de lipidation est la suivante : Atg8 (4 μ M), Atg7 (1 μ M), Atg3 (1 μ M), ATP (1 mM). La protéine Atg8 fut marquée avec des particules d'or de 5 nm (le détail du marquage est donné dans [72]). (B) Quantification des particules d'or au niveau des zones de contact (CR) entre deux liposomes. À gauche une représentation schématique de deux liposomes avec leur zone de contact et leur zone de non-contact (non-CR). Sur le premier graphique (blanc) les longueurs des CR et des non-CR des membranes des liposomes ont été reportées. Puis sur le deuxième graphique (gris), le nombre de particules d'or dans chaque région a été compté. Sur le dernier graphique (noir), la densité linéaire de particule dans chaque région a été calculée en divisant le nombre de particules d'or dans chaque région par la longueur de la région. Au niveau de la CR, la longueur de la région compte double puisque deux membranes sont apposées. Extrait de [72].

La protéine Atg8 a une fonctionnalité controversée dans la fusion membranaire. Des tests de fusion sur des liposomes Atg8-PE montraient une implication variable d'Atg8 dans l'hémifusion (fusion du feuillet externe de la bicouche) et la fusion (fusion des deux feuillets) des membranes. Les tests de fusion sont basés sur du

dequenching de fluorescence, le principe est de mélanger des liposomes sans lipide fluorescent avec des liposomes contenant des lipides NBD et lissamine rhodamine B (Rho) en concentration suffisamment élevée pour que le signal du NBD soit quenché par la Rho (Fig. 3.10). Si les liposomes fusionnent il y a alors un dequenching de la NBD et son signal fluorescent augmente [77]. Cependant le simple dequenching de la fluorescence du NBD ne permet pas de déterminer si la fusion des membranes s'est faite sur le feuillet externe de la bicouche ou bien sur les deux feuillets. L'utilisation de la dithionite de sodium permet de distinguer ces deux cas de figure. Cette molécule permet d'éteindre le signal du fluorophore NBD. Dans le cas de liposomes, elle éteint uniquement les NBD présents sur la paroi externe car elle ne traverse pas les membranes. En ajoutant de la dithionite de sodium à une solution de liposomes Atg8-PE issue d'un test de fusion positif, une diminution de 50 % du signal de la NBD indiquerait une fusion des membranes et une diminution de 100 % l'hémifusion des membranes (Fig. 3.10).

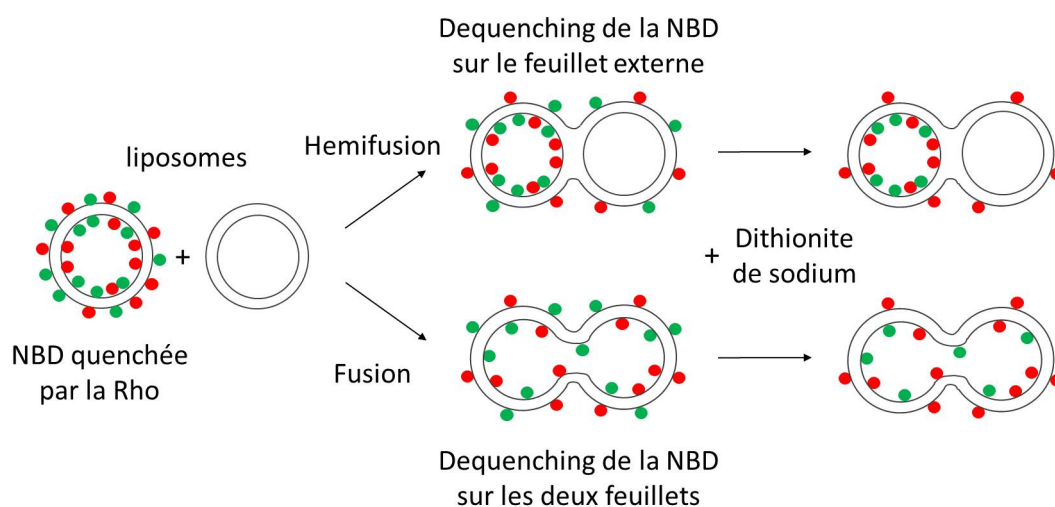
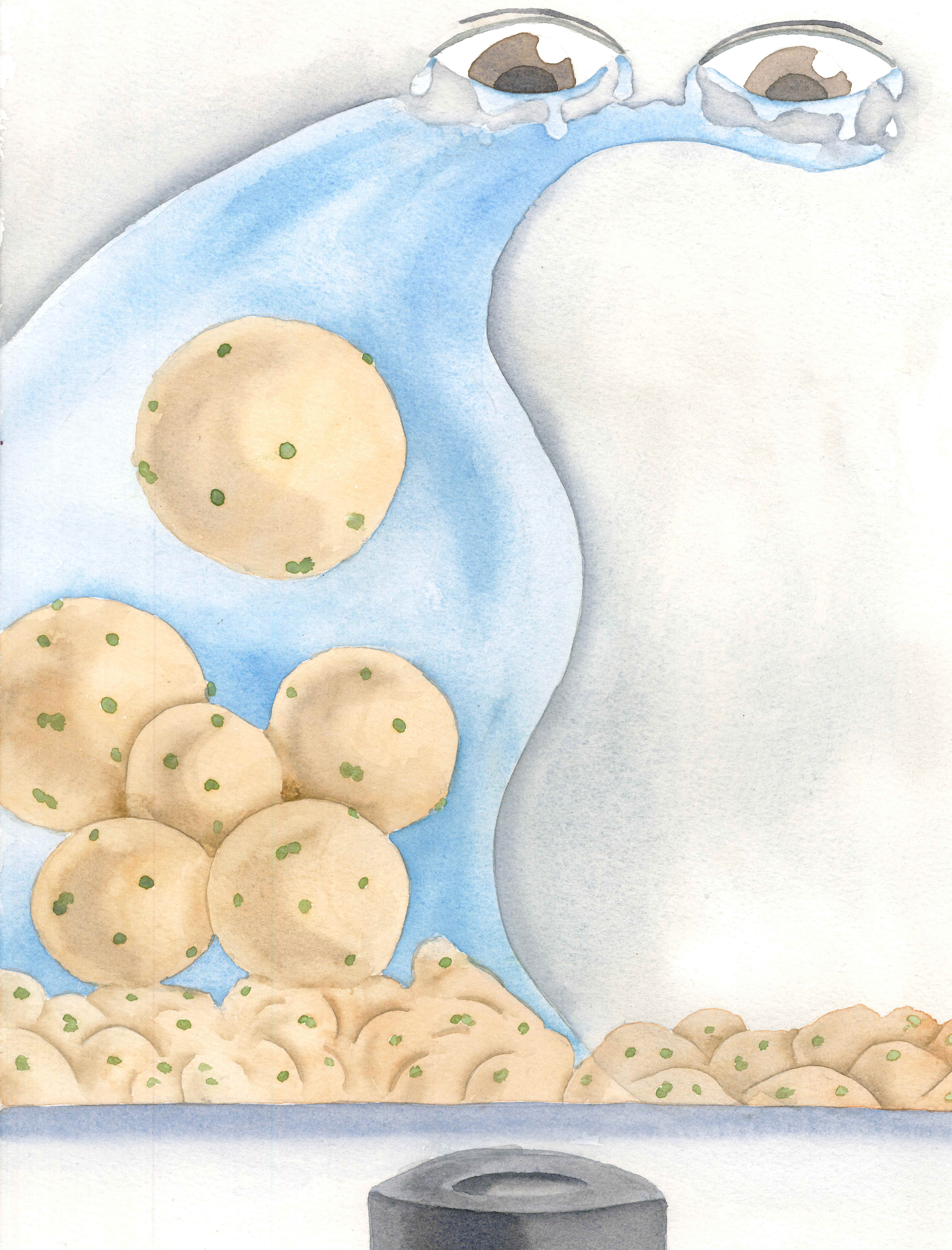


FIGURE 3.10: **Schéma des tests de fusion par dequenching de fluorescence de la NBD sur des petits liposomes.** La NBD est représentée par les disques verts et la rhodamine par les disques rouges.

Ces tests de fusion ont été menés sur des liposomes Atg8-PE et ont montré que les membranes avaient hémifusionné [72]. Cependant les liposomes contenaient 55 % de lipides PE ce qui est bien supérieur aux concentrations physiologiques qui se situent autour de 20 %. Les mêmes tests de fusion avec des liposomes contenant 30 % de lipides PE montrent l'absence de fusion [74]. L'implication d'Atg8 dans la fusion membranaire est donc toujours sujette à discussion. Des tests de fusion réalisés sur des liposomes LC3-PE et des liposomes GATE16-PE montrent une

fusion totale des membranes pour des concentrations physiologiques en lipides PE [75, 76]. Le rôle des homologues mammifères d'Atg8 semble donc différent mais nous ne savons pas à ce jour en expliquer les raisons. D'autres études menées chez les levures montrent une implication de la protéine de fusion SNARE lors de la nucléation du PA, c'est donc elle qui pourrait permettre la fusion des membranes isolées lors de la croissance du PA [74].

L'implication de la protéine GL1 dans l'adhésion des membranes et potentiellement leur fusion confirme le rôle de GL1 dans la croissance du PA. En effet, GL1 permettrait l'adhésion des membranes isolées lors de l'élongation du PA et éventuellement leur fusion. Cependant ces résultats ne permettent pas d'expliquer une croissance asymétrique du PA, nous allons donc chercher à déterminer si le



Chapitre 4

La méthode du choc osmotique

Les interactions de la protéine GL1 avec la membrane restent à ce jour peu caractérisées. Par exemple, très peu de choses sont encore connues de la dynamique de GL1 sur la membrane et de l'influence des caractéristiques de la membrane sur la dynamique de la protéine. Nous nous proposons, d'incorporer la protéine GL1 dans des GUVs, ce modèle nous permettant de répondre à ces questions restées en suspens et pourtant essentielles à la compréhension de l'activité de la protéine.

Dans ce chapitre, nous montrerons en quoi les GUVs sont difficilement adaptables à la réaction de lipitation appliquée sur des petits liposomes. Puis, nous expliquerons le nouveau protocole que nous avons été amené à développer pour incorporer la protéine GL1, dans des GUVs. Nous présenterons ensuite un ensemble de mesures caractérisant l'efficacité de cette méthode.

4.1 Difficultés d'adaptation des GUVs aux réactions de lipitation appliquées sur des petits liposomes.

La reconstitution de la protéine GL1 dans des GUVs représentait un challenge, dû à la nature quasi unique de l'ancrage de la protéine dans la bicouche. Nous ne pouvions pas utiliser de méthodes préexistantes de formation de protéo-GUVs qui étaient le plus souvent destinées à l'insertion de protéines trans-membranaire [78–81]. Nous nous appliquerons dans cette partie à exposer la conséquence du

changement de taille des liposomes sur la lipidation de GL1 au travers des deux stratégies de lipidation.

4.1.1 Les caractéristiques membranaires des GUVs limitent l'incorporation de GL1

La reconstitution de GL1^{G116} dans des petits liposomes est bien maîtrisée [68, 72]. Cependant, le passage des petits liposomes à des liposomes géants entraîne des modifications profondes de la structure de la membrane qui limitent l'incorporation de GL1^{G116} et obligent à repenser le protocole traditionnel. En effet, nous n'avons jamais pu visualiser la protéine GL1^{G116} en fluorescence sur la membrane des GUVs en utilisant la réaction de lipidation employée sur des petits liposomes. Les GUVs utilisées lors de ces tests étaient électroformées en utilisant la méthode développée par Angelova [82] et détaillée en annexe L. Pour la décrire simplement, cette technique consiste en l'application d'un courant alternatif sur un film de lipide déposé sur des plaques d'ITO et réhydraté dans de l'eau. Les GUVs formées à l'issue de l'électroformation sont grandes (10 μm – 100 μm) et nombreuses. L'ancrage de GL1^{G116} sur les GUVs était inexistant ou inférieur à notre limite de détection de fluorescence. Bien que certaines équipes, aient pu obtenir des résultats positifs, des différences significatives dans la composition lipidique des GUVs ou dans le système d'ancrage de la protéine [76] montre que la lipidation de la protéine sur des GUVs par la réaction naturelle est peu efficace. Une équipe a pu reconstituer la protéine Atg8 dans des GUVs via la réaction enzymatique en utilisant des GUVs composées à 68 % de lipides PE [73], cette concentration étant largement supérieure à des concentrations physiologiques.

Pour nos compositions qui sont plus physiologiques avec 30 – 40 % de lipide PE, La faible incorporation de GL1^{G116} est certainement due au faible ancrage de la protéine Atg3 et Atg3^{K11W}. En effet, les défauts membranaires nécessaires à la liaison d'Atg3 sont certainement moindres sur la surface des GUVs, leur membrane est moins tendue et se replie ce qui pourrait limiter l'accessibilité aux parties hydrophobes de la membrane. L'utilisation de protéines Atg3 et Atg3^{K11W} exprimées avec une YFP au N-terminal atteste cette hypothèse. Nous rappelons ici que la protéine Atg3 mutante est moins sensible aux défauts présents à la surface de la bicouche. Lors du mélange de la protéine Atg3 avec des GUVs contenant 40 % de lipides PE, aucun signal fluorescent de la protéine n'était observé sur la membrane

(Fig. 4.1). Dans des conditions expérimentales identiques, l'utilisation de la protéine Atg3^{K11W} donnait des résultats irréguliers. En général, aucun signal n'était visible sur la membrane, mais quelquefois un faible signal était observable alors que les conditions d'expérimentation étaient identiques. Nous ne savons pas aujourd'hui expliquer ces variabilités dans nos observations. Puisque les protéines Atg3 et Atg3^{K11W} ne s'ancraient pas ou peu dans la membrane, nous étions convaincus que la membrane des GUVs ne permettait pas un bon recrutement de GL1^{G116}.

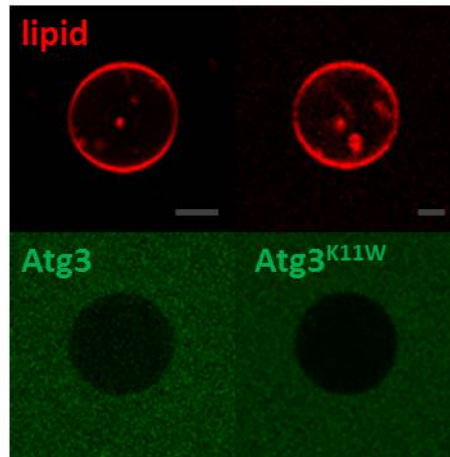


FIGURE 4.1: **Ancrage de la protéine Atg3 ou Atg3^{K11W} sur des GUVs.** Des GUVs préparées par électroformation (DOPE 40 mol%, POPC 49 mol%, POPS 10 mol%, DOPE-rhodamine 1 mol%) étaient mixées avec 1 μ M de protéine Atg3 ou Atg3^{K11W}. Le mélange incubait à température ambiante, la photo de la GUV mélangée avec de la protéine Atg3 a été prise après 10 min d'incubation, celle avec la protéine Atg3^{K11W} 180 min. Les images sont prises au microscope confocal en fluorescence celle du haut correspondent à la rhodamine (rouge) et celle de bas à la YFP (vert). Barre d'échelle : 10 μ m.

Une autre stratégie consistait à utiliser la protéine mutante GL1^{G116C} se liant directement à un lipide maléimide et ne nécessitant pas d'enzyme, ce qui permettait d'éviter l'utilisation de la protéine Atg3. Cependant, cette méthode fut tout aussi inefficace. Nous supposons que la cystéine au C-terminal de la protéine n'était pas suffisamment accessible dû à la forme globulaire de la protéine, ce qui ne permettait donc pas un ancrage significatif de GL1^{G116C}. Des tests menés en parallèle sur des bicouches supportées de composition identique à celles des GUVs (5 mol% de DOPE maléimide, 85 mol% POPC, 10 mol% POPS) confortent cette hypothèse. La protéine ne s'incorporait pas ou très faiblement de façon spécifique. Les bicouches étaient préparées avec une cuve de Langmuir et la protéine GL1^{G116C} était directement ajoutée sur la bicouche à une concentration de 1 μ M, le détail

du protocole est donné en annexe M. En général, l'ancrage de la protéine sur la bicouche était non spécifique comme le montre les signaux fluorescents relevés après injection de la protéine sur des bicouches avec et sans lipide maléimide (Fig. 4.2). Nous avons pu obtenir un faible ancrage spécifique seulement une fois au cours d'une série d'expériences, pour des raisons inconnues.

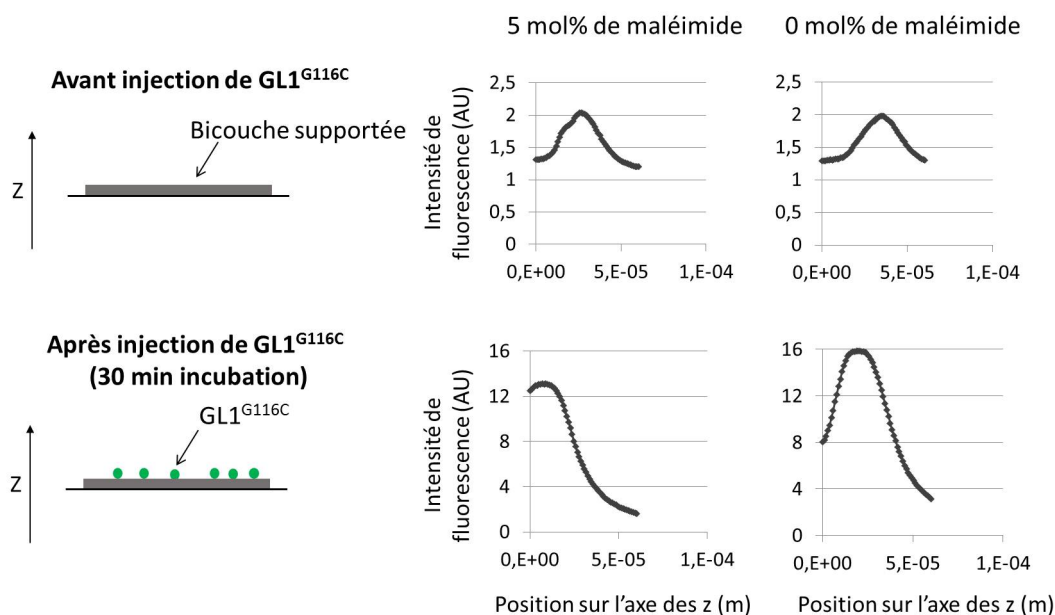


FIGURE 4.2: **Ancrage de la protéine $GL1^{G116C}$ sur des bicouches supportées.** Les bicouches sont préparées avec une cuve de Langmuir, les compositions sont les suivantes : 5 mol% de DOPE maléimide, 85 mol% POPC, 10 mol% POPS ou 90 mol% POPC, 10 mol% POPS (contrôle négatif). La protéine GL1 est ajoutée sur la bicouche à une concentration de 1 μ M. La bicouche incube ensuite 30 min à température ambiante avant l'observation au microscope confocal. Un stack en z est ensuite réalisé au niveau de la bicouche pour relever le signal fluorescent de l'YFP, la bicouche se situe au niveau du pic de fluorescence. Les schémas représentent la bicouche avant et après l'injection de $GL1^{G116C}$. Les graphiques du haut correspondent au signal fluorescent relevé avant l'injection de la protéine sur les bicouches avec 5 mol% de maléimide (gauche) et 0 mol% de maléimide (droite). Les graphiques du bas correspondent au signal fluorescent relevé après l'injection de la protéine sur les bicouches avec 5 mol% de maléimide (gauche) et 0 mol% de maléimide (droite).

4.1.2 Faible concentration lipidique d'une solution de GUV

Une autre raison pour le faible ou l'inexistant couplage de la protéine GL1 sur des GUVs peut être évoquée. Lors de la réaction de lipidation des protéines $GL1^{G116}$ et $GL1^{G116C}$ la concentration en lipides des petits liposomes est de 3 mM (annexe

C et D) or la concentration en lipide d'une solution de GUVs est beaucoup plus faible. En effet, dans le cadre de nos expériences, la quantité de lipides séchés sur la plaque d'ITO est d'environ 10 μ l à une concentration de 1 mM. Le volume de réhydratation est d'environ 1 ml. La concentration finale en lipides de la solution de GUVs est donc inférieure à 0,01 mM. Or, la concentration en lipides nécessaire à la réaction de lipidation est de 3 mM, nous ne pouvons donc pas l'atteindre en partant d'une solution de lipides déjà moins concentrée. Lors de nos réactions de lipidation sur les GUVs, selon les concentrations des enzymes et protéines, la concentration en lipides était comprise entre 0,01 mM et 0,001 mM. La concentration la plus élevée étant obtenue lors de la réaction de lipidation de GL1^{G116C} qui nécessitait l'ajout de peu de composants. La très faible concentration en lipides lors de la réaction de lipidation est un facteur limitant qui a certainement diminué le rendement de la réaction.

L'ancrage des protéines GL1^{G116} et GL1^{G116C} directement sur des GUVs fut inefficace. Afin de contourner les difficultés dues à la concentration en lipides des solutions de GUVs et aux caractéristiques des membranes des GUVs, nous avons pris pour point de départ des petits protéo-liposomes avec lesquels nous avons formé des protéo-GUVs en utilisant une méthode inventée à cet effet basée sur un choc osmotique.

4.2 Formation de GUVs avec la méthode du choc osmotique

Les protocoles de lipidation de GL1 sur des petits liposomes appliqués à des GUVs ne permettaient pas un ancrage suffisant de la protéine. Nous avons donc été amenés à développer un nouveau protocole s'appuyant sur un choc osmotique. Il est conçu pour la formation de GUVs et de protéo-GUVs. Dans un premier temps, nous expliquerons cette méthode en l'absence de protéine puis dans la partie 4.5, nous l'expliquerons avec des protéines.

Cette méthode repose sur un choc osmotique appliqué à des petits liposomes déshydratés dans du tampon, en y ajoutant de l'eau. La tension qui s'exerce sur la membrane lors de l'ajout d'eau devient supérieure à la tension de lyse (voir 1.5.1). Alors les membranes s'ouvrent et se referment en incorporant des membranes voisines elles aussi ouvertes, la structure finale devient plus grande. En répétant ce cycle

plusieurs fois, la taille des structures finales atteint des dizaines de micromètres. Un protocole détaillé est donné en annexe E ou dans l'article Motta et al. [83] donné à la fin de ce manuscrit, ici nous le décrivons rapidement (Fig. 4.3). Des petits liposomes sont préparés avec une concentration en lipides de 3 mM. Une lamelle de verre est nettoyée à l'isopropanol, puis séchée avec un jet d'air. Une goutte de 2 μ l de solution de liposomes est déposée sur la lamelle et laissée sécher à température ambiante sous pression atmosphérique. Cette goutte est ensuite réhydratée avec de l'eau pure, environ 6 μ l, pour être laissée sécher à nouveau dans les mêmes conditions. Elle est réhydratée une dernière fois avec un volume d'eau plus large, 10 à 20 μ l, afin de pouvoir effectuer des observations au microscope. Plusieurs cycles de déshydrations réhydratations peuvent être nécessaires pour former de larges structures, en général, deux sont suffisants. Les GUVs se forment du film de lipide réhydraté et plus particulièrement dans les zones de fortes concentrations, elles poussent en l'espace de quelques minutes. Il est important de noter que la température de l'échantillon lors de la réhydratation doit être supérieure à la plus haute température de transition du lipide présent. Pour des lipides insaturés la température ambiante est donc suffisante, en revanche pour des lipides saturés il faut maintenir l'échantillon dans un incubateur ou sur des plaques chauffantes (voir 1.2.2).

4.3 Calcul de la tension de lyse

L'étape clef de la méthode du choc osmotique est la réhydratation des petits liposomes séchés dans du buffer par de l'eau pure. L'osmolarité de la solution de liposomes à sécher est d'environ 350 mosm, ce qui correspond à une pression osmotique d'environ $P_{\text{osm}} = 10^6$ Pa à température ambiante (voir 1.5.2). En ajoutant de l'eau sur des liposomes de 400 nm de diamètre (D), la tension de surface induite (τ) peut se calculer en connaissance de la pression osmotique (P_{osm}) (voir 1.5.1) :

$$\tau = \frac{DP_{\text{osm}}}{4} \quad (4.1)$$

La tension de surface induite dans notre cas est d'environ 0,1 N/m. Elle est donc largement supérieure à la tension de lyse des membranes estimée à 10^{-2} N/m [15]. L'hydratation avec de l'eau déclenche donc un choc osmotique qui détruit partiellement la cohésion de la membrane. Les morceaux de membrane se réassemblent

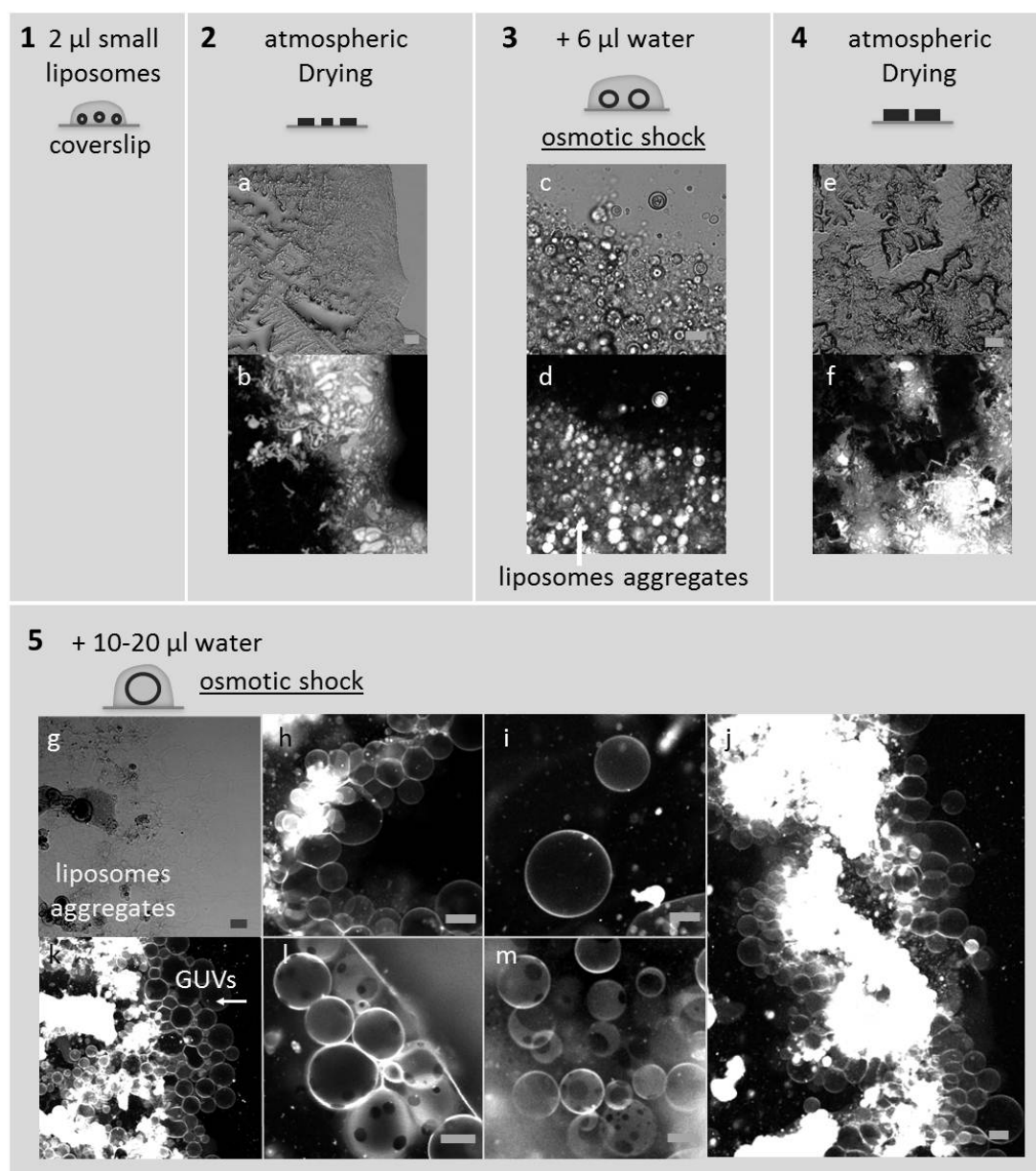


FIGURE 4.3: **Méthode du choc osmotique.** (1) Une goutte de 2 μl de petits liposomes (3 mM de lipides) dans du buffer est déposée sur une lamelle de verre. (2) La goutte est séchée à température ambiante (ou température supérieure à la plus haute température de transition du lipide présent) sur une paillasse. (3) 6 μl d'eau sont déposés sur la goutte séchée et déclenche la formation d'agrégats de petites vésicules. (4) La goutte est séchée une nouvelle fois de la même façon que précédemment. (5) 10 - 20 μl d'eau sont ajoutés sur la goutte séchée et en quelques minutes des GUVs poussent. Des GUVs ont été formées pour deux compositions lipidiques, 99 mol% DOPC, 1 mol% DOPE-ATTO647 (a – k) ou 39 mol% DOPC, 40 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol, 1 mol% DOPE-ATTO647 (l – m). Les images sont prises au microscope confocal. Les images a, c, e, g sont prises en transmission, les autres images sont prises en fluorescence (ATTO 647). Barre d'échelle : 10 μm .

immédiatement avec des membranes voisines et forment des structures plus larges. Lorsque les liposomes sont séchés une seconde fois, leur large structure est préservée et lors de la seconde réhydratation les liposomes se forment à partir de structures plus larges ce qui conduit à des structures encore plus grandes. A la suite de la première hydratation, l'osmolarité à l'intérieur des liposomes est divisée d'un facteur 2 à 3, dépendant du volume d'hydratation, donc la tension de surface diminue mais elle reste supérieure à la tension de lyse.

4.4 Paramètres variables de la méthode du choc osmotique

La méthode du choc osmotique est très flexible dans son utilisation et peut s'appliquer dans des conditions différentes de celles décrites précédemment. Nous avons donc étudié cette méthode en variant différents paramètres : la concentration en sel de la solution de liposomes, sa composition saline ainsi que sa concentration en lipides dans la solution de liposomes initiale.

4.4.1 Concentration en sel de la solution de liposomes initiale

La concentration en sel de la solution de liposomes joue un rôle important. D'une part elle doit être suffisamment élevée pour que le choc osmotique ait lieu. En reprenant le calcul de la tension de surface induite dans la partie 4.3, nous pouvons faire le calcul inverse et retrouver l'osmolarité correspondant à la tension de lyse des membranes estimée à 10^{-2} N/m, elle est donc d'environ 35 mosm pour des liposomes de 400 nm de diamètre. Dans le cas d'une solution de liposomes composée uniquement de NaCl, la concentration doit être supérieure à environ 20 mM. D'autre part elle doit assurer des conditions physiologiques pour les protéines qui y seront incorporées (protocole détaillé dans la partie suivante). En fixant la concentration en lipide de la solution de petits liposomes à 10 mM (89 mol% POPC, 10 mol% POPS, 1 mol% DOPE-rhodamine), la méthode du choc osmotique fut testée pour des concentrations en NaCl suivantes : 1 M, 500 mM et 200 mM. Pour 1 M de NaCl, aucune GUVs ne poussait, à 500 mM les résultats sont plus variables, quelques GUVs poussaient mais plus généralement des extensions de membranes

qui ne se détachaient pas du substrat. Pour 200 mM, les GUVs poussaient de façon optimale, elles étaient en grand nombre et de grande taille (10 μm – 50 μm) (Fig. 4.4).

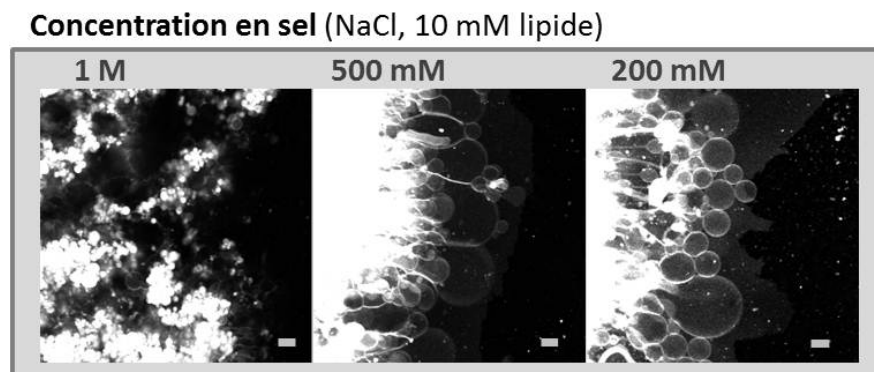


FIGURE 4.4: **Variation de la concentration en sel de la solution de liposomes.** Les liposomes sont composés de 89 mol% POPC, 10 mol% POPS, 1 mol% DOPE-rhodamine. La concentration en lipide des petits liposomes est fixée à 10 mM et la composition de la solution de petits liposome est NaCl. La concentration en NaCl varie de 1 M à 200 mM. Les images sont prises au microscope confocal en fluorescence (rhodamine). Barre d'échelle : 10 μm .

4.4.2 Composition saline de la solution de liposomes initiale

La composition de la solution saline des liposomes peut être variée, elle ne doit cependant pas contenir de substances limitant les effets du choc osmotique, tel le sucrose, le glucose et le glycérol. Ces dernières forment une fine couche sur les liposomes ce qui rend le séchage très long et protège les membranes lors de l'hydratation avec l'eau (Fig. 4.5). Les solutions salines testées qui assuraient toujours un bon fonctionnement furent KCl (140 mM) et NaCl (100 mM) + TrisHCl (50 mM) pH 7,6 pour une concentration en lipide de 10 mM de la solution de liposomes (89 mol% POPC, 10 mol% POPS, 1 mol% DOPE-rhodamine) (Fig. 4.6).

4.4.3 Concentration en lipides de la solution de liposomes initiale

La concentration en lipide de la solution initiale de petits liposomes doit être suffisamment élevée pour que, du film de lipides séchés, des structures plus larges

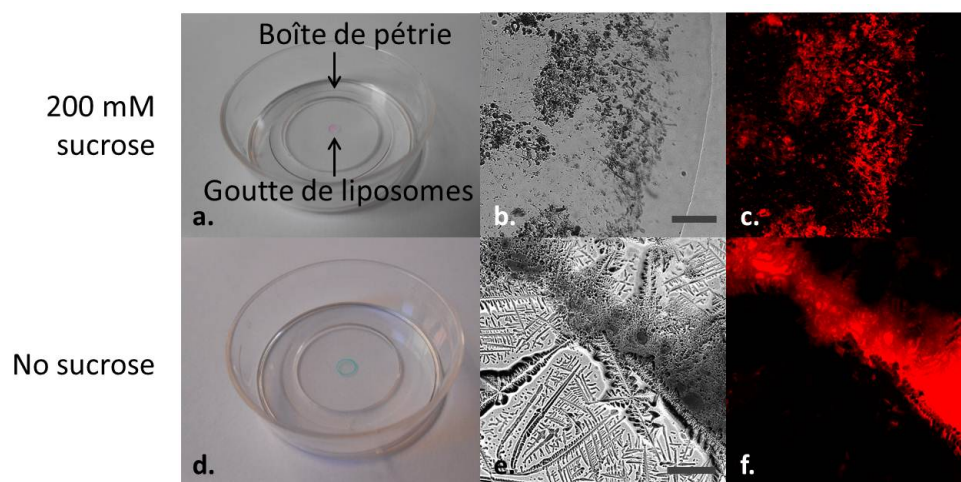


FIGURE 4.5: **Séchage de liposomes préparés dans du sucrose.** Des liposomes (99 mol% DOPC, 1 mol% DOPE-rhodamine) ont été préparés dans du buffer NaCl (100 mM), TrisHCl (50 mM) pH 7,6 ou dans du buffer NaCl (100 mM), TrisHCl (50 mM) pH 7,6, sucrose (200 mM). Les liposomes séchés préparés dans du buffer avec sucrose correspondent aux images a, b et c. Les liposomes séchés préparés dans du buffer sans sucrose correspondent aux images d, e et f. Nous constatons que les liposomes séchés dans du sucrose ne sont pas complètement secs comparés aux liposomes préparés dans le buffer sucrose qui forment des cristaux. Les images a et d sont prises avec un appareil photo. Les images b, c, e, et f sont prises au microscope confocal, les images b et e en transmission et les images c et f en fluorescence (rhodamine). Barre d'échelle : 10 μm .

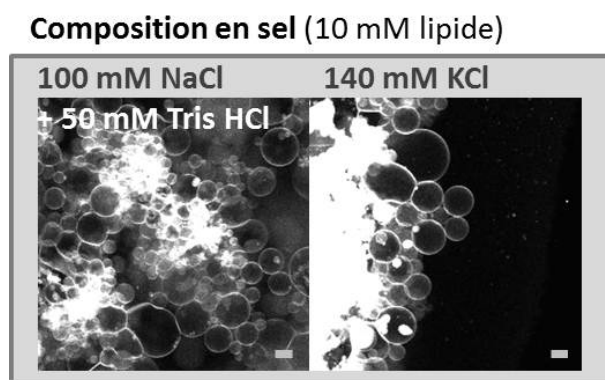


FIGURE 4.6: **Variation de la composition de la solution de liposomes.** Les liposomes sont composés de 89 mol% POPC, 10 mol% POPS, 1 mol% DOPE-rhodamine. La concentration en lipides des liposomes est fixée à 10 mM et la composition de la solution varie comme indiquée sur les images. Les images sont prises au microscope confocal en fluorescence (rhodamine). Bar d'échelle : 10 μm .

puissent pousser. En revanche, une concentration trop élevée en lipide limite l'apparition de grands liposomes, les membranes restant agrégées. La méthode du choc osmotique fut testée pour quatre concentrations en lipide 10 mM, 3 mM, 1 mM et 0,3 mM à une composition en sel fixée à 100 mM de NaCl (composition lipidique : 89 mol% POPC, 10 mol% POPS, 1 mol% DOPE-rhodamine) (Fig. 4.7). Des GUVs poussaient en très grand nombre pour 10 mM et 3 mM de lipides, en revanche pour 1 mM les résultats étaient plus variables et les GUVs étaient en général moins nombreuses. Nous supposons qu'à 1 mM la concentration était trop faible. Enfin pour 0,3 mM très peu de GUVs poussaient, le film de liposomes séchés était arraché lors de l'hydratation et cela probablement à cause du flux généré par l'injection de la goutte. Cet effet peut être limité en déposant délicatement l'eau cependant en dessous d'une certaine concentration en lipide, cela n'est plus suffisant.

Concentration en lipides (100 mM NaCl)

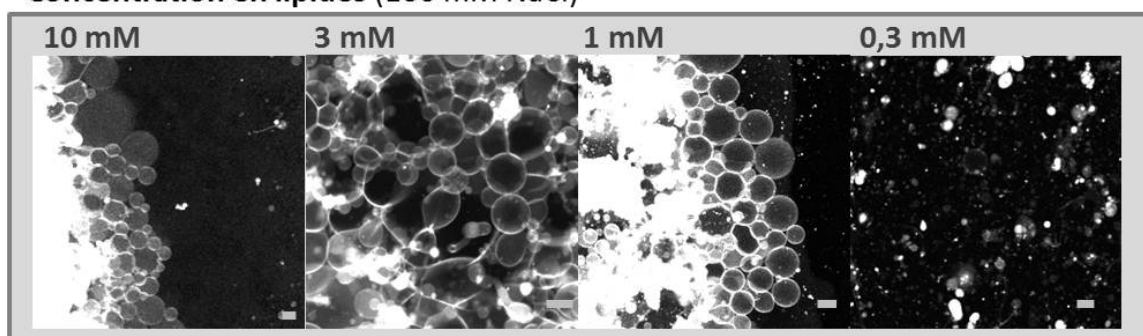


FIGURE 4.7: **Variation de la concentration en lipides de la solution de liposomes.** Les liposomes sont composés de 89 mol% POPC, 10 mol% POPS, 1 mol% DOPE-rhodamine. La composition de la solution de liposomes est fixée à 100 mM NaCl, et la concentration en lipides des liposomes varie de 0,3 mM à 10 mM. Les images sont prises au microscope confocal en fluorescence (rhodamine).

Barre d'échelle : 10 μ m.

Pour la poursuite du projet avec la protéine GL1, nous avons fixé la concentration en lipides à 3 mM et la composition du buffer à 100 mM NaCl + 50 mM TrisHCl (pH 7,6) qui correspond au buffer dans lequel la protéine est purifiée.

4.5 Formation de protéo-GUVs avec la méthode du choc osmotique

La méthode du choc osmotique a été présentée précédemment sur des liposomes ne contenant pas de protéine. Dans cette partie nous montrerons l'efficacité de cette méthode pour la formation de GUVs GL1-PE et plus généralement de protéo-GUVs. Ensuite, une quantification de la protéine sur la membrane sera réalisée ainsi qu'un test montrant la conservation de la structure tridimensionnelle de la protéine après son incorporation.

4.5.1 La méthode du choc osmotique pour la formation de protéo-GUVs

La méthode du choc osmotique est identique pour la formation de GUVs ou de protéo-GUVs. La seule différence réside dans les liposomes du départ qui doivent contenir des protéines. Les mêmes cycles d'hydratation/déshydratation sont appliqués aux protéo-liposomes qui forment alors des protéo-GUVs.

Cette méthode fut appliquée avec succès sur GL1^{G116}, GL1^{G116C} et deux protéines trans-membranaires t-SNARE et TolC. La t-SNARE fait partie d'un complexe protéique permettant la fusion des membranes, son domaine trans-membranaire est composé d'une hélice alpha (Fig. 1.16). La protéine TolC fait partie d'un hétérodimère qui forme une pompe à efflux chez la bactérie *Escherichia coli*. Elle est elle-même un homotrimère qui forme un tonneau inséré dans la membrane (Fig. 1.16). Les études sur les protéines trans-membranaires ont été menées par deux personnes de mon laboratoire, je ne détaillerai donc pas leurs résultats. Cependant, il est important de remarquer que la méthode du choc osmotique est applicable à des protéines dont les systèmes d'ancrage sont différents, il n'est donc pas spécifique à la protéine GL1.

Les protéines GL1^{G116} et GL1^{G116C} furent incorporées dans des petits liposomes suivant le protocole décrit dans la partie 3.3.1 et en annexes C et D. Le taux de lipidation des protéines GL1 peut varier de 100 % à 50 %, nous pouvions le mesurer sur gel. Une portion de la protéine GL1^{G116} ou GL1^{G116C} peut donc rester à l'état soluble dans la solution de liposomes GL1-PE et dans le cas de la réaction ubiquitine les enzymes sont aussi présentes à l'état soluble. Ces protéines

ne sont pas retirées avant l'application de la méthode du choc osmotique, donc la solution de liposomes GL1^{G116}-PE contient aussi 1-5 μM d'Atg3^{K11W}, 1-2 μM d'Atg7 et jusqu'à 7 μM de protéines GL1^{G116} solubles et la solution de liposomes GL1^{G116C}-PE peut contenir jusqu'à 7 μM de protéines GL1^{G116C} solubles. Lors de la formation des GUVs GL1^{G116}-PE (Fig. 4.8.A) et des GUVs GL1^{G116C}-PE (Fig. 4.8.B) puis de leur observation, ces protéines sont en solution ou bien collées sur le verre. Les protéines GL1 solubles créent un fond lumineux qui doit être pris en compte lors de l'analyse du signal fluorescent sur les membranes (annexe F).

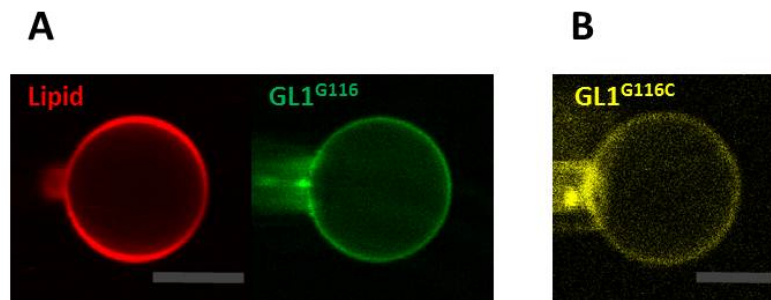


FIGURE 4.8: **GUV GL1^{G116}-PE et GUV GL1^{G116C}-PE micromanipulés.** (A) GL1^{G116}-PE GUV de composition 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC, 1 mol% DOPE-ATTO647. Les photos sont prises au microscope confocal en fluorescence, la photo de gauche (rouge) correspond au lipide (ATTO647) et la photo de droite (verte) à GL1^{G116} (Alexa488). (B) GL1^{G116C}-PE GUV de composition 2 mol% DOPE-maléimide, 88 mol% DOPC, 10 mol% POPS. La photo est prise au microscope confocal en fluorescence, elle montre la protéine GL1^{G116C} (jaune, YFP). Barre d'échelle : 10 μm .

4.5.2 Quantification de la protéine GL1 incorporée dans la membrane des GUVs

La quantité de protéines GL1^{G116} incorporée dans la membrane des GUVs à la suite du choc osmotique a été estimée grâce au signal fluorescent du dye Alexa488 lié à la protéine. N'ayant pu trouver un lipide fluorescent Alexa488 nous permettant d'établir une échelle de concentration du lipide en fonction de l'intensité du signal fluorescent, nous avons utilisé un fluorophore intermédiaire [84]. Un rapport de fluorescence, entre le fluorophore ATTO488 soluble et le dye Alexa488 soluble, a été déterminé en solution pour des conditions d'excitation et d'observation identiques (Fig. 4.9.A). Ces mesures ont été effectuées pour différentes concentration en dye et le rapport ATTO488/Alexa488 trouvé fut 2 (détail du protocole en annexe N).

Puis, des GUVs ont été préparées contenant différentes concentrations molaires de DOPE-ATTO488. Le signal fluorescent a été mesuré à la membrane comme décrit en annexe F dans des conditions d'excitation et d'observation identiques à celles utilisées pour la mesure de la fluorescence des fluorophores en solution, afin d'établir une échelle de fluorescence du lipide DOPE-ATTO488 en fonction de sa concentration (Fig. 4.9.B). En considérant le ratio ATTO488/Alexa488 la courbe de concentration du dye Alexa488 à la membrane en fonction de l'intensité du signal fluorescent a pu être établie (Fig. 4.9.C). Il faut ensuite prendre en compte le taux de marquage de GL1^{G116} de 5 % (Fig. 4.9.D).

Nous trouvons environ 1 protéine GL1^{G116} pour 500 lipides, ce rapport variant peu d'une expérience à l'autre. Sachant que lors de la réaction de lipidation, nous comptons 1 protéine pour 300 lipides, 60 % de la protéine se trouve incorporé dans les GUVs. La méthode du choc osmotique ne nous permet pas de contrôler les sens d'incorporation des protéines, nous pouvons donc estimer une répartition équitable entre le feuillet externe et interne de la membrane des GUVs. La concentration en GL1^{G116}-PE incorporée dans la paroi extérieure s'élève donc à 1 protéine pour 1000 lipides. Au niveau de l'autophagosome, des mesures montrent une concentration de la protéine GL1 sur la bicouche de 1 sur 2000 nm² ce qui équivaut à 1 protéine pour 3000 lipides [85]. Nous travaillons donc avec des concentrations du même ordre de grandeur.

4.5.3 Fonctionnalité de GL1 ancré sur les GUVs

Lors de la formation des GL1^{G116}-PE GUVs, les protéines sont sujettes à des cycles de déshydratation et réhydratation. Ce traitement pourrait modifier le repliement de la protéine et donc avoir des conséquences sur sa fonctionnalité. Nous avons donc soumis les GL1^{G116}-PE GUVs à un test de clivage avec la protéase RavZ prouvant la conservation de la structure tridimensionnelle de la protéine.

Sur des membranes biologiques ou modèles, GL1^{G116}-PE est un substrat pour la protéase RavZ, produite par la bactérie *Legionella pneumophila* [37] (voir 2.1.2), la protéine est clivée entre le 115ème et le 116ème résidu (Fig. 4.10). Il est important de noter que ni la protéine GL1^{G116} seule ni la protéine GL1^{G116}-PE solubilisée dans du détergent ne sont reconnues par RavZ et clivées, le clivage témoigne donc d'une bonne incorporation de GL1^{G116} dans la membrane. De même, si la protéine GL1^{G116} perd sa structure tridimensionnelle, elle n'est pas reconnue par RavZ.

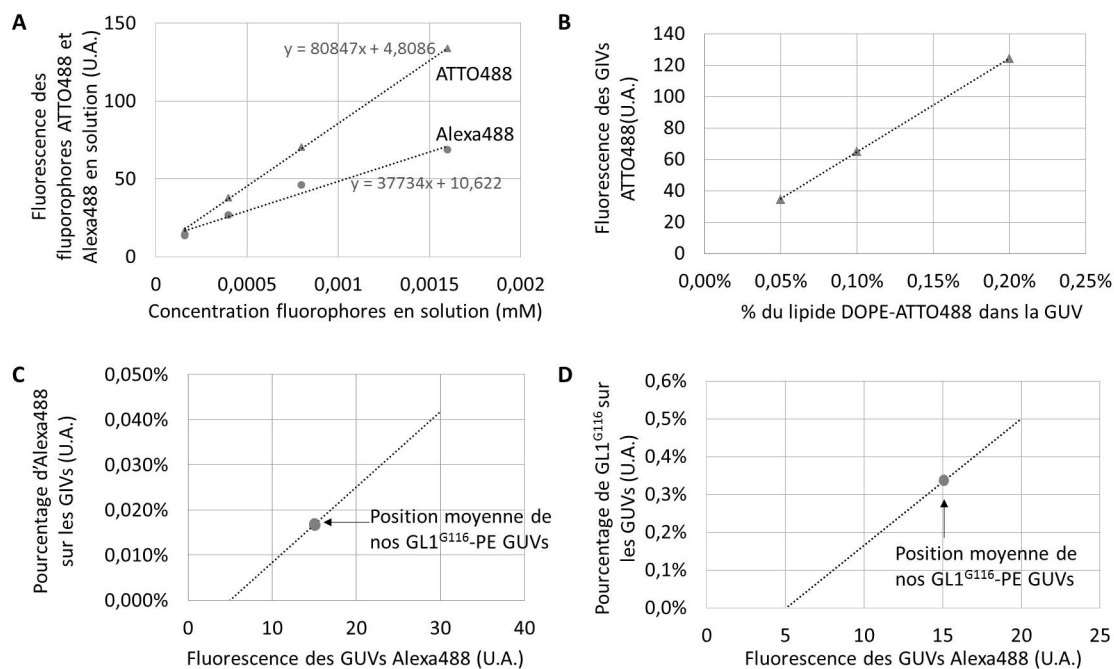


FIGURE 4.9: **Quantification de la protéine GL1^{G116} incorporée dans la membrane de GUVs avec la méthode du choc osmotique.** (A) Graphique de l'intensité de fluorescence des fluorophores ATTO488 et Alexa488 en solution pour différentes concentrations en mM. (B) Graphique de l'intensité de fluorescence des GUVs pour différents pourcentages molaires de DOPE-ATTO488 incorporés. Les GUVs ont été préparées avec la méthode du choc osmotique et sont composées de lipides DOPC et de lipides DOPE-ATTO488. (C) Graphique du pourcentage molaire d'Alexa488 sur les GUVs en fonction de l'intensité de fluorescence à la membrane. Ce graphique a été construit grâce aux graphiques (A) et (B). Le point gris indique la position des GUVs GL1^{G116}-PE, statistiques réalisées sur une vingtaine de GUVs. L'intersection de la droite avec l'axe des x pour une intensité de fluorescence non nulle signifie que le fond fluorescent est non nul. Il est dû aux protéines GL1^{G116} non incorporées, il peut donc varier d'une expérience à l'autre et doit être remesuré à chaque expérience. (D) Graphique du pourcentage molaire de GL1^{G116} incorporés dans la membrane des GUVs en fonction du signal fluorescent d'Alexa488 à la membrane. Le point gris indique la position des GUVs GL1^{G116}-PE.

De ce fait, l'activité protéolytique de RavZ sur GL1^{G116} peut être utilisée comme témoin de la conservation de sa structure tridimensionnelle.

Au préalable à la réaction de clivage, les petits liposomes GL1^{G116}-PE ont été incubés 20 min à température ambiante, à 41 °C ou bien à 90 °C, afin de tester l'effet de la température sur le repliement de la protéine. Puis, 10 nM de protéines RavZ ont été ajoutés et la mixture placée à 37 °C pendant 10 min. Enfin, l'ancrage de GL1^{G116} dans la membrane a été contrôlé sur gel (Fig. 4.11). Ce test

Séquence GL1

10	20	30	40	50	60
MKFQYKEDHP	FEYRKKEGEK	IRKKYPDRVP	VIVEKAPKAR	VPDLDKRKYL	VPSDLTVGQF
70	80	90	100	110	
YFLIRKRIHL	RPEDALFFV	NNTIPPTSAT	MGQLYEDNHE	EDYFLYVAYS	DESVYGK

| Clivage RavZ

FIGURE 4.10: **Site de clivage de la protéase RavZ.** Séquence de la protéine GL1, le site de clivage de la protéine RavZ est indiqué par la ligne pointillée située entre le 115ème et le 116ème résidu.

de clivage a été réalisé sur deux populations de petits liposomes avec des compositions lipidiques différentes, une première composée de 30 mol% DOPE et 70 mol% DOPC (composition 1), une seconde de 30 mol% DOPE, 10 mol% DOPC, 40 mol% DPPC et 20 mol% cholestérol (composition 2). Le clivage de la protéine restée à température ambiante est complet, celui de la protéine incubée à 90°C est inexistant puisque la protéine a perdu sa structure tridimensionnelle et enfin celui de la protéine incubée à 41°C est quasi-total, signifiant qu'une faible portion de la protéine s'est dépliée.

Ensuite, nous avons testé le clivage de la protéine directement sur des GUVs GL1^{G116}-PE en les incubant avec 10 nM de RavZ à température ambiante pendant 40 min. Lors de leur formation les GUVs GL1^{G116}-PE étaient placées à 41 °C, donc si nous voulons comparer le clivage des protéines sur les GUVs à celui sur les petits liposomes, il faut prendre pour point de comparaison les liposomes incubés 20 min à 41 °C. Ce test de clivage a été réalisé sur deux populations de GUVs avec des compositions identiques à celles utilisées pour les petits liposomes (composition 1 et 2). Le signal fluorescent de la protéine sur les GUVs s'est trouvé réduit de 51 ± 12 % dans la population de GUVs de composition 1 et de 63 ± 8 % dans la population de GUVs de composition 2. Puisque, la protéine est répartie de façon équitable sur les deux côtés de la bicouche, celle sur la paroi interne reste inaccessible et seules les protéines présentes sur la paroi externe pouvaient être clivées (Fig. 4.12). En conclusion, toutes les protéines GL1^{G116}-PE accessibles ont été clivées ce qui signifie que la protéine conserve sa structure tridimensionnelle après utilisation de la méthode du choc osmotique à 41 °C et cela pour différentes compositions lipidiques des bicouches.

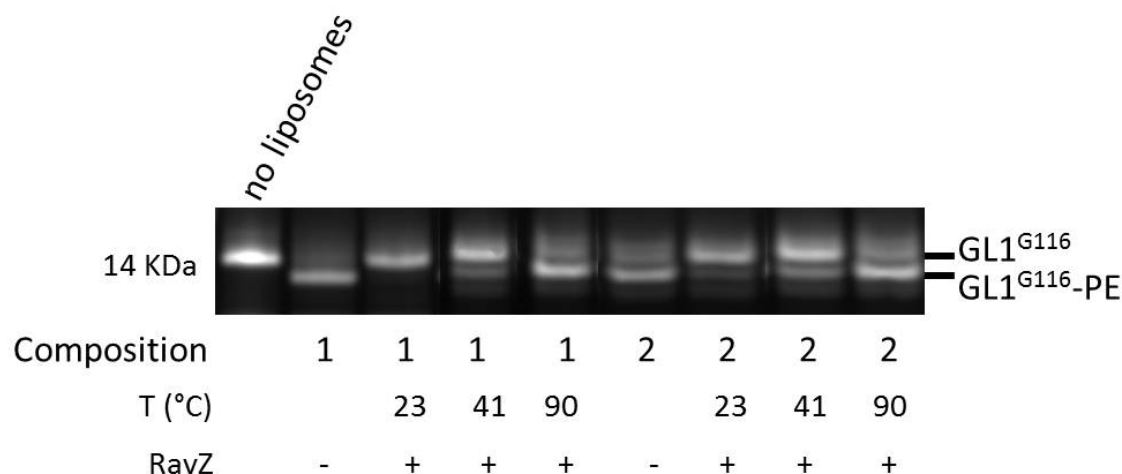


FIGURE 4.11: **Clivage de GL1^{G116} ancré sur des petits liposomes par la protéase RavZ.** Gel des solutions de liposomes GL1^{G116}-PE pour deux compositions lipidiques, composition 1 : 30 mol% DOPE et 70 mol% DOPC, composition 2 : 30 mol% DOPE, 10 mol% DOPC, 40 mol% DPPC et 20 mol% cholestérol. Après la réaction de lipidation les solutions de GL1^{G116}-PE liposomes étaient incubées pendant 20 min à 23 °C (température ambiante), à 41 °C ou à 90 °C. La protéase RavZ était ensuite ajoutée à la solution de liposomes GL1^{G116}-PE à une concentration de 10 nM, la mixture était ensuite incubée 10 min à 37 °C. La photo du gel est prise en fluorescence (Alexa 488).

L'activité protéolytique de RavZ ne fonctionne pas sur les GUVs GL1^{G116C}-PE puisque la glycine G116 a été mutée en une cystéine, nous n'avons donc pas pu tester le repliement de la protéine GL1^{G116C} après l'application du choc osmotique. Néanmoins étant données les similarités structurales de GL1^{G116} et GL1^{G116C}, nous pouvons supposer que la protéine GL1^{G116C} a conservé sa structure tridimensionnelle.

4.6 Unilamellarité des vésicules formées par la méthode du choc osmotique

Afin de démontrer l'unilamellarité des vésicules géantes formées par la méthode du choc osmotique, nous avons analysé le signal fluorescent du lipide ATTO647 incorporé dans la membrane selon une méthode développée par Akashi [86]. Cette analyse a été réalisée sur des GUVs et des GUVs GL1^{G116}-PE.

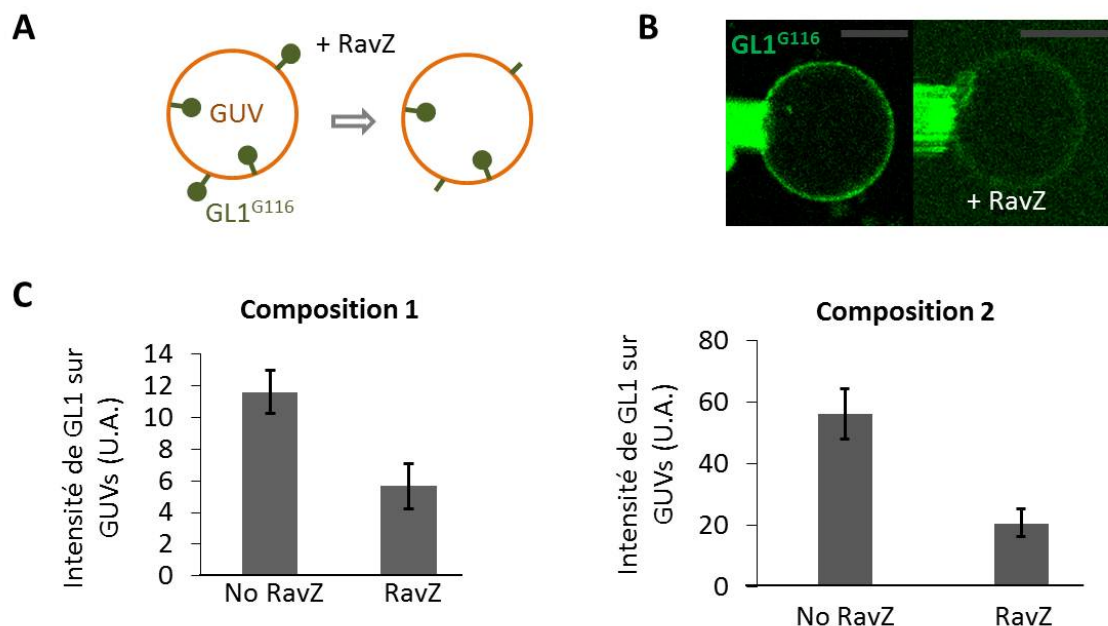


FIGURE 4.12: Clivage de GL1^{G116} ancré sur des GUVs par la protéase RavZ. Le test de clivage a été effectué sur deux populations de GUVs de compositions différentes, composition 1 : 30 mol% DOPE et 70 mol% DOPC, composition 2 : 30 mol% DOPE, 10 mol% DOPC, 40 mol% DPPC et 20 mol% cholestérol. Après la formation des GUVs GL1^{G116}-PE avec la méthode du choc osmotique, 10 nM de protéase RavZ était ajouté. La mixture était ensuite incubée 40 min à température ambiante. **(A)** Schéma du clivage de GL1^{G116} incorporé dans une GUV, les protéines ancrées sur la paroi interne ne sont pas accessibles elles ne peuvent donc pas être clivées. **(B)** Images prises au microscope confocal en fluorescence (Alexa488) de GUVs GL1^{G116}-PE micromanipulées avant et après l'ajout de RavZ. Barre d'échelle : 10 μ m. **(C)** graphique des intensités de fluorescence d'Alexa488 sur la membrane des GUVs avant et après l'ajout de RavZ, pour les compositions 1 (à gauche) et 2 (à droite). Les différences d'intensité de fluorescence entre les compositions 1 et 2 proviennent d'une différence de réglage du microscope lors de l'observation.

Les GUVs et les GUVs GL1^{G116}-PE contiennent 1 % de lipide ATTO647 dans leur membrane. En mesurant l'intensité du signal fluorescent du lipide à la membrane pour un grand nombre de vésicules, 2 à 4 populations peuvent se distinguer (Fig. 4.13.A), la mesure de l'intensité de fluorescence à la membrane de la GUV est décrite en annexe F. La distribution de ces intensités présente des pics multiples du pic le plus faible. Ce dernier étant le signal fluorescent émis par une bicouche. Les vésicules formées par la méthode du choc osmotique sont à 82 % unilamellaires et les vésicules GL1^{G116}-PE le sont à 68 % (Fig. 4.13.B et C). La diminution de la proportion de vésicules unilamellaires lorsque celles-ci portent la protéine GL1^{G116} n'est pas surprenante. En effet, en solution les petits liposomes

GL1^{G116}-PE s'agrègent rapidement (voir 3.4), puisque GL1^{G116} entraîne l'adhésion des membranes [72], la présence de la protéine favorise donc les structures multilamellaires lors de la formation des GUVs GL1^{G116}-PE par la méthode du choc osmotique.

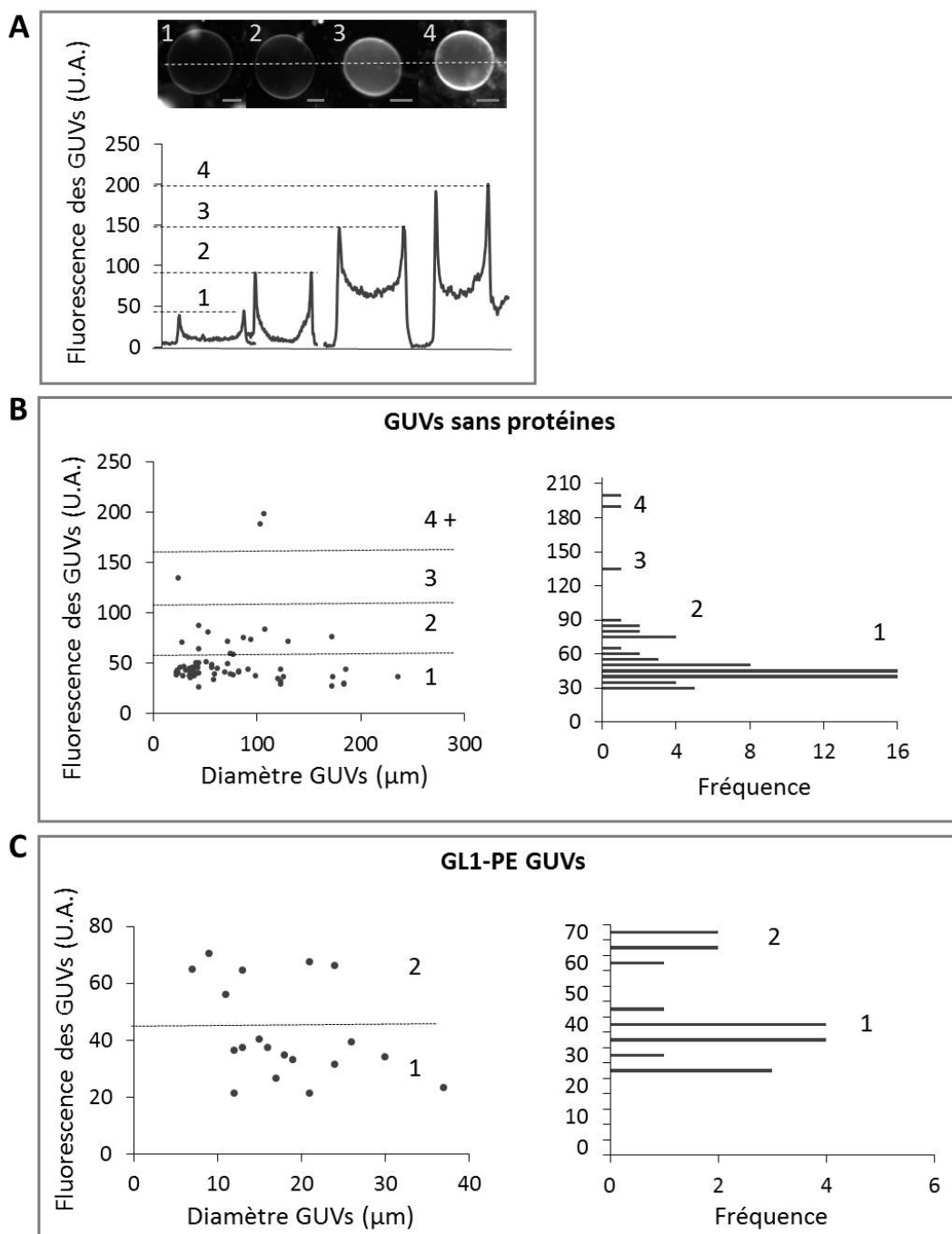
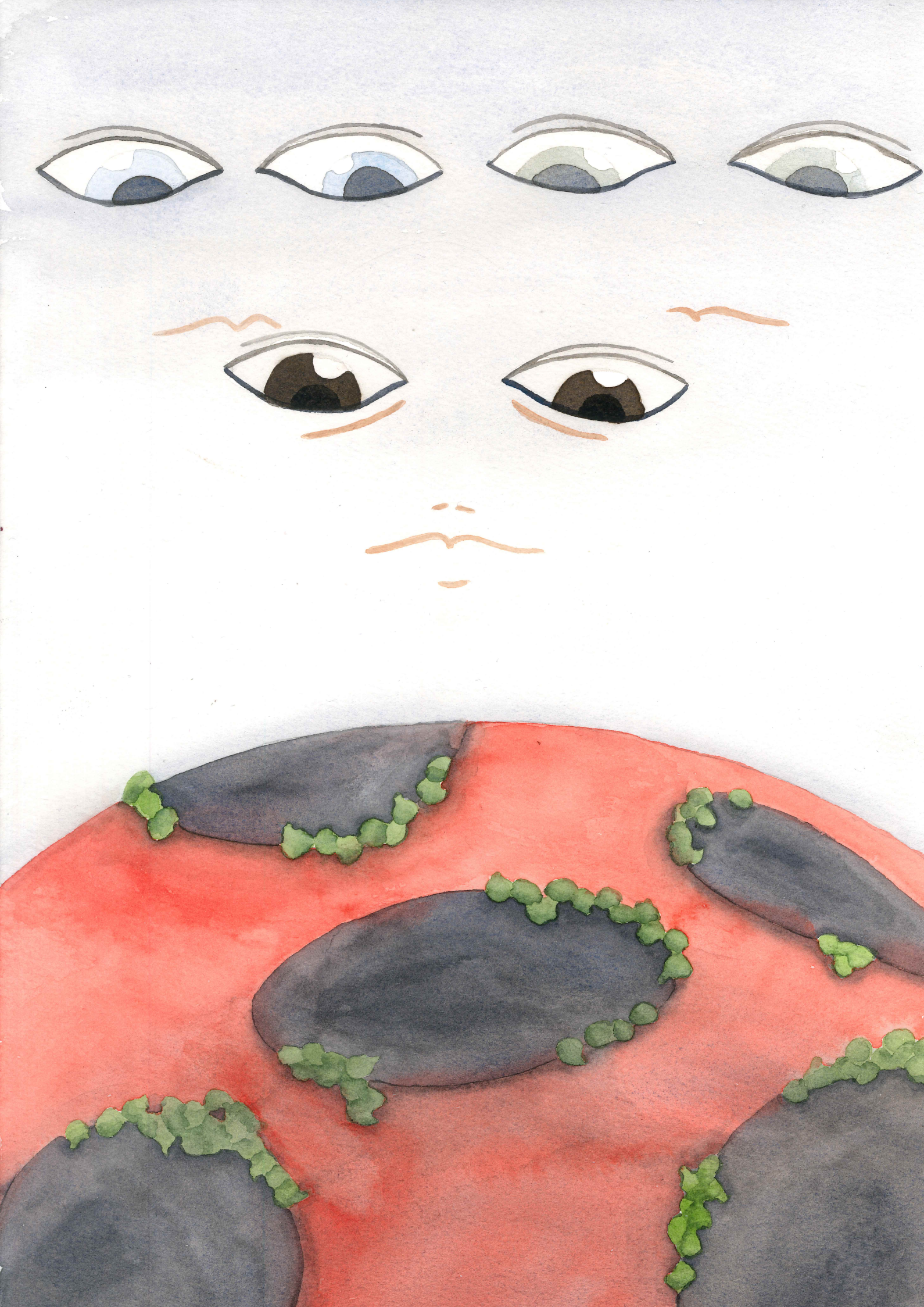


FIGURE 4.13: **Unilaméllarité des vésicules et GL1^{G116}-PE vésicules formées par la méthode du choc osmotique.** La composition des GUVs est 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC, 1 mol% DOPE-ATTO647. **(A)** Les pics d'intensité de fluorescence (ATTO647) à la membrane des GUVs sont des multiples du pic le plus faible. Ce dernier étant le signal fluorescent émis par une bicouche. Les images sont prises au microscope confocal et donnent l'exemple de vésicules formées d'1, 2, 3 et 4 bicouches. Le graphique montre l'intensité de fluorescence relevée au niveau de la ligne pointillée blanche. Barre d'échelle : 10 μm. **(B)** Distribution de fluorescence de vésicules formées par la méthode du choc osmotique. Quatre populations peuvent se distinguer, 82 % des vésicules sont unilaméllaires. **(C)** Distribution de fluorescence de GL1^{G116}-PE vésicules formées par la méthode du choc osmotique. Deux populations se distinguent, 68% des GL1^{G116}-PE vésicules sont unilaméllaires.



Chapitre 5

Répartition et oligomérisation de GL1 sur des bicouches plates de différentes compositions

Lors de sa croissance, l'autophagosome adopte une forme de coupe, il croît donc de façon asymétrique. L'intervention de machineries protéiques sur la membrane du PA lors de sa formation s'opère donc très probablement de façon non uniforme à sa surface. Notre protéine d'étude GL1 qui rappelons-le est le marqueur de l'autophagosome et est responsable de l'adhésion des membranes, se répartie très certainement de façon inégale sur le PA. De plus, le fort potentiel de GL1 à l'oligomérisation (voir [2.3.3](#)), laisse supposer que des associations de la protéine en cis joueraient un rôle dans son activité. Dans le but de déterminer des conditions membranaires qui justifieraient une répartition spécifique ou une oligomérisation de la protéine, nous nous sommes intéressés aux rafts. Ces derniers sont présents sur les membranes cellulaires et jouent un rôle biologique notamment dans la répartition des protéines. Nous avons donc reconstitué la protéine GL1 dans des GUVs avec des microdomaines et nous avons étudié sa répartition et son oligomérisation.

Dans ce chapitre, nous étudierons dans un premier temps la répartition de GL1 sur des GUVs avec des microdomaines en fonction de la chaîne lipidique d'ancrage de la protéine. Ensuite, nous nous intéresserons à l'oligomérisation de la protéine en analysant d'abord sa diffusion puis en réalisant des expériences de photoblanchiment par palier.

5.1 Répartition de GL1 en fonction de la chaîne lipidique d'ancrage

5.1.1 Intérêt biologique et exemple des vacuoles chez *saccharomyces cerevisiae*

La présence de domaines lipidiques sur les membranes biologiques a été observée à plusieurs reprises [10, 87]. Nous savons aujourd'hui qu'ils jouent un rôle dans la régulation de l'activité protéique [8]. La composition lipidique de l'autophagosome étant inconnue, nous supposons que de tels domaines peuvent être présents sur sa membrane, et nous cherchons à en déterminer les conséquences potentielles sur la répartition de la protéine GL1.

Nous pouvons illustrer le rôle biologique des domaines en détaillant des expériences menées récemment sur les vacuoles de *Saccharomyces cerevisiae* [8]. A la suite de leur croissance, ces cellules ont une phase stationnaire durant laquelle leur vacuole occupe la plus grande partie de leur volume et mesure de 1 à 5 μm , ce qui fait de la vacuole un modèle d'étude de choix car il est directement observable au microscope. Lors de la croissance la cellule, la protéine Vph1 considérée comme le marqueur de la vacuole est répartie de façon quasi homogène à sa surface à l'exception d'une zone proche du noyau. Cependant lorsque la cellule rentre en phase stationnaire des domaines de la taille du micromètre apparaissent à la surface de la vacuole et la protéine se trouve ségrégée. Les différentes phases sont rendues visibles car les cellules observées expriment la protéine Vhp1 avec un marqueur GFP. La même expérience a été répétée sur douze autres protéines présentes sur la vacuole et elles se ségrègent dans la même phase que Vhp1, en revanche deux protéines (Gtr2p et Ivy1p) se ségrègent dans l'autre phase (Fig. 5.1). La composition de chacune de ces phases n'est pas connue mais l'utilisation du marqueur filipine qui se lie aux stérols a révélé que les phases où la protéine Ivy1p se ségrégait était riches en stérols. Ces microdomaines à la surface de la vacuole de *Saccharomyces cerevisiae* entraînent donc une répartition spécifique des protéines.

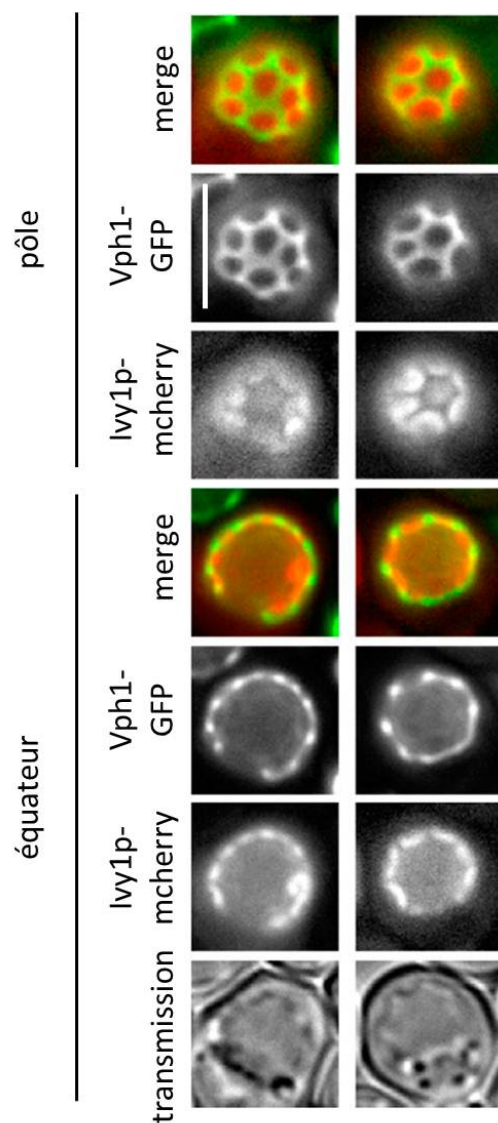


FIGURE 5.1: **Ségrégation de protéines sur des domaines présents sur les vacuoles de *Saccharomyces cerevisiae* à l'état stationnaire.** Cellules de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant Vph1-GFP et Ivy1-mCherry à l'état stationnaire visualisées par microscopie de fluorescence. Bar d'échelle : 5 μm . Extrait de [8].

5.1.2 Compositions lipidiques des GUVs

Dans le but d'étudier la répartition de la protéine GL1^{G116} sur des GUVs présentant des microdomaines, nous avons choisi des compositions lipidiques permettant la formation de domaines à température ambiante. Les compositions lipidiques choisies sont donc les suivantes 40 mol% de lipides saturés, 39 mol% de lipides insaturés, 20 mol% de cholestérol et 1 mol% de DOPE-ATTO647, le pourcentage de lipide PE est fixé à 30 %. Nous avons aussi testé l'influence de la chaîne lipidique d'ancrage de la protéine sur sa répartition. La protéine GL1^{G116} a donc été alternativement ancrée sur des lipides DOPE, DPPE et DMPE. Les compositions lipidiques sont complétées avec les lipides DOPC et DPPC de façon à conserver les proportions lipides saturés/lipides insaturés/cholestérol à 2/2/1 (Fig. 5.2).

Lipides	Composition 1	Composition 2	Composition 3
DOPE	30	-	-
DPPE	-	30	-
DMPE	-	-	30
DOPC	9	39	39
DPPC	40	10	10
Cholestérol	20	20	20
DOPE-ATTO647	1	1	1

FIGURE 5.2: Composition lipidique des GUVs avec des microdomaines.

Dans un premier temps, nous avons testé la formation de GUVs avec ces compositions sans protéine. Lors de la réhydratation des petits liposomes, la température n'était pas portée à plus de 41 °C afin que la protéine qui serait par la suite ajoutée ne soit pas dégradée. Néanmoins, les T_M de certains lipides dépassaient les 41 °C, 63 °C pour la DPPE et 50 °C DMPE. Il est donc possible que tous les lipides saturés ne se soient pas bien incorporés dans la membrane des GUVs même si des microdomaines étaient visibles (Fig. 5.3).

Nous avons mesuré la température de transition de phase de nos GUVs avec des microdomaines pour une composition lipidique (composition 1), afin de vérifier qu'elle correspondait à celle précédemment trouvée [88]. Pour cela, les GUVs étaient chauffées ou refroidies simultanément à leur observation et lors du changement de phase,

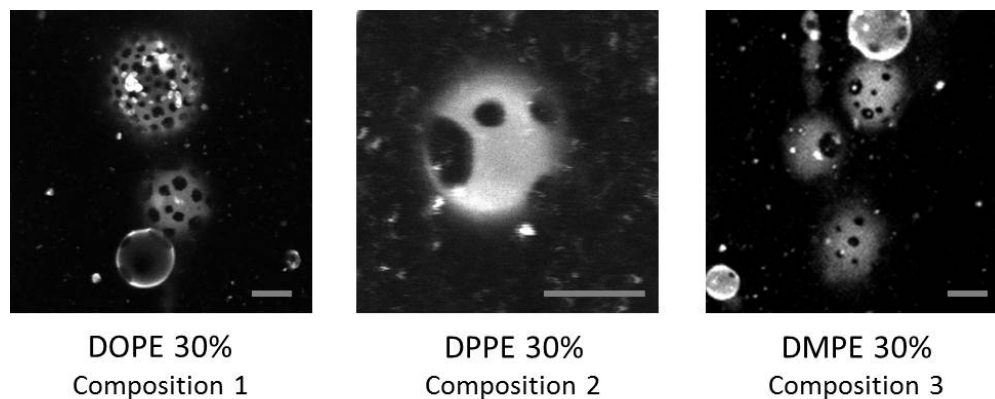


FIGURE 5.3: **GUVs avec des microdomaines.** Ces GUVs ont été formées avec la méthode du choc osmotique à 41 °C. Leur observation s'est faite à température ambiante. Les compositions testées sont ; composition 1 : 30 mol% DOPE, 9 mol% DOPC, 40 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647 (gauche), composition 2 : 30 mol% DPPE, 39 mol% DOPC, 10 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647 (milieu), composition 3 : 30 mol% DMPE, 39 mol% DOPC, 10 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647 (droite). Image confocale en fluorescence (ATTO647). Barre d'échelle : 10 μ m.

la température était relevée. Nous avons trouvé une température de transition de 31 ± 1 °C qui correspond à celle répertoriée dans la littérature (Fig. 5.4).

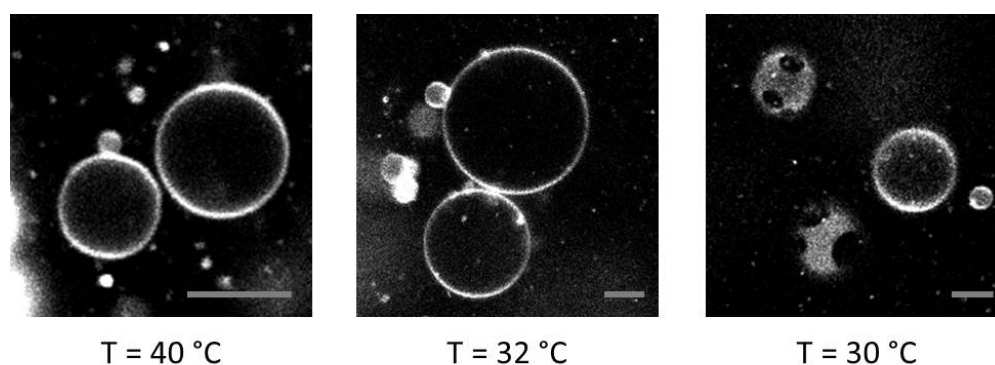


FIGURE 5.4: **Température de transition de GUVs avec microdomaines.** Des GUVs de composition 1 (30 mol% DOPE) ont été formées par la méthode du choc osmotique à 41 °C. Puis la température a été diminuée simultanément à l'observation. Des microdomaines apparaissaient pour une température inférieure à 31 ± 1 °C. Ce phénomène était réversible, les domaines disparaissaient lorsque la température était reportée au-dessus de 31 °C. Image confocale en fluorescence (ATTO647). Barre d'échelle : 10 μ m.

5.1.3 Lipidation sur des petits liposomes

Dans un premier temps, la réaction de lipidation de GL1^{G116} sur des petits liposomes de composition 1, 2 et 3 a été vérifiée sur gel ainsi que le clivage de la protéine par RavZ. Seule la réaction enzymatique sera utilisée pour ancrer la protéine GL1 dans la membrane, car elle est la plus représentative du système biologique. La protéine GL1^{G116} est incorporée avec succès sur toutes les bicouches et se clive, ce qui atteste un bon repliement de la protéine (Fig. 5.5). Les réactions de lipidation et de clivage sont identiques à celles décrites précédemment (voir 3.3.1, 4.5.3 et annexes C et G). Cependant, nous notons en général un rendement de la réaction de lipidation légèrement plus faible lorsque les lipides PE sont saturés. Ces observations s'expliquent une nouvelle fois par l'ancrage de l'hélice amphiphile de la protéine Atg3^{K11W} (voir 2.3.5). Lors de la réaction de lipidation qui a lieu à 37 °C, les lipides DPPE et DMPE ont une structure rigide dans la bicouche ce qui favorise la compaction de la membrane et limite la formation de défauts (voir 1.2.2). En conséquence la protéine Atg3^{K11W} se lie moins.

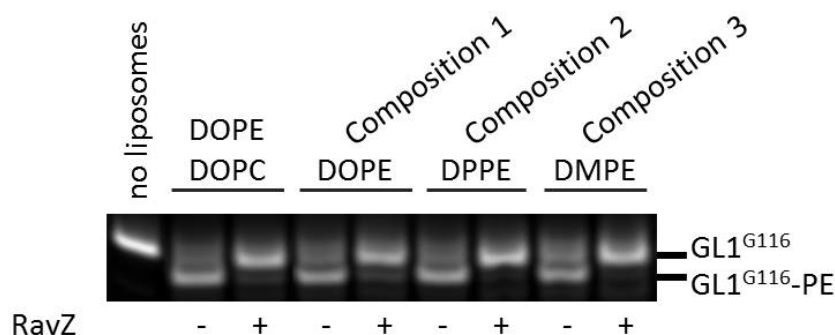


FIGURE 5.5: **Lipidation et clivage de GL1^{G116} sur des petits liposomes.** La réaction de lipidation a été réalisée sur des petits liposomes suivant la méthode décrite en annexes C et G en utilisant la protéine Atg3^{K11W}, pour quatre compositions lipidiques différentes ; 30 mol% DOPE 69 mol% DOPC et 1 mol% DOPE-ATTO647 et les compositions 1, 2 et 3 (Fig. 5.2). La photo du gel est prise en fluorescence (Alexa488).

5.1.4 Répartition de GL1 sur les GUVs

Des GUVs GL1^{G116}-PE ont été formées à partir des petits liposomes GL1^{G116}-PE décrits dans la partie précédente en utilisant la méthode du choc osmotique. La protéine GL1^{G116} ancrée sur un lipide DOPE est ségrégée dans la phase liquide

désordonnée (Fig. 5.6). Et si elle est attachée à un lipide saturé DPPE ou DMPE, elle se localise dans la phase liquide ordonnée et se concentre fortement à la limite des deux phases ou peut-être dans une troisième phase en formant des agrégats (Fig. 5.6). Il semblerait donc que la répartition de GL1^{G116} dans des domaines lipidiques est conditionnée par la chaîne du lipide PE. Toutefois, les observations avec les lipides PE saturés ont été difficilement reproductibles. Le plus souvent, la protéine ne semblait pas présente ou était en quantité trop faible sur la membrane et n'était pas détectable. Plusieurs raisons permettent d'expliquer ce résultat, la température de transition de ces lipides saturés est supérieure à 41 °C (DPPE 63 °C et DMPE 50 °C), cependant lors de la réhydratation des petits liposomes GL1^{G116}-PE, l'échantillon n'était pas chauffé à plus de 41 °C afin de préserver la protéine, en conséquence les lipides saturés s'incorporaient mal dans la membrane. De plus, puisque d'après nos quelques observations les protéines GL1^{G116}-DPPE et GL1^{G116}-DMPE s'agrègent sur la membrane des GUVs, elles s'agrègent très probablement aussi sur la membrane des petits liposomes et lors de l'application du choc osmotique les protéines restent piégées dans l'agrégat de liposomes. Les effets de la température conjugués à ceux de l'agrégation de la protéine sur la membrane doivent fortement perturber la formation des GUVs GL1^{G116}-DPPE et GL1^{G116}-DMPE lors de l'étape de réhydratation de la méthode du choc osmotique.

Malgré les difficultés pour effectuer ces observations, un comportement clair de la protéine se dégage. La chaîne lipidique du lipide d'ancrage est déterminante dans la répartition de GL1 à la surface de bicouches présentant des microdomaines. Liée à des lipides insaturés la protéine se ségrège dans la phase liquide désordonnée et accrochée à des lipides saturés, la protéine s'agrège à la limite des phases liquides ordonnées et désordonnées. Une si forte agrégation de la protéine, si elle a lieu sur une membrane biologique, joue certainement un rôle dans son activité. Toutefois, la présence de tels lipides saturés sur l'autophagosome est peu probable, l'analyse du lipidome par Ejsing (voir 2.2.2) révèle la présence en très faible concentration d'un seul lipide PE saturé 12 : 0 16 : 0 [2]. Un tel comportement n'est cependant pas à exclure car une faible concentration en lipides saturés PE serait suffisante pour induire une forte concentration de la protéine. Ces expériences montrent donc l'importance de la composition de la membrane et de la chaîne du lipide d'ancrage sur la répartition de la protéine GL1^{G116} à la surface de la bicouche.

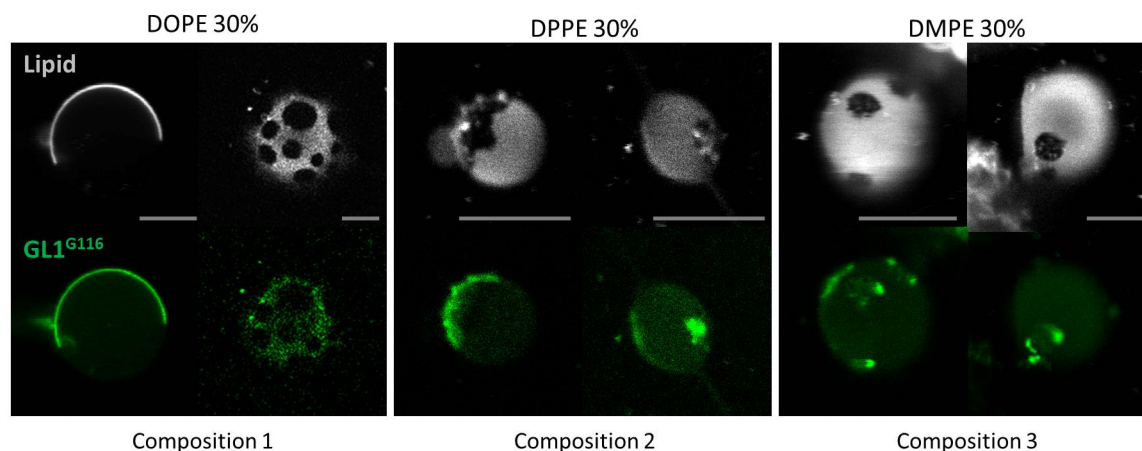


FIGURE 5.6: **Répartition de GL1^{G116}-PE selon la chaîne du lipide d'ancrage.** Des GL1^{G116}-PE GUVs ont été formées par la méthode du choc osmotique à partir des liposomes décrits dans la partie précédente 5.1.3. Les compositions lipidiques sont les suivantes ; composition 1 : 30 mol% DOPE, 9 mol% DOPC, 40 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647 (gauche), composition 2 : 30 mol% DPPE, 39 mol% DOPC, 10 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647 (milieu), composition 3 : 30 mol% DMPE, 39 mol% DOPC, 10 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647 (droite). Image confocale en fluorescence du lipid (gris, ATTO647) et de GL1^{G116} (vert, Alexa488). Barre d'échelle : 10 μ m.

5.2 Diffusion de GL1-PE sur la membrane

Dans la partie précédente nous avons vu que les protéines GL1^{G116}-PE s'agrégeaient si le lipide PE était saturé ou se partitionnait dans la phase liquide désordonnée si le lipide était insaturé. Même si la protéine GL1^{G116}-DOPE ne s'agrégeait pas de façon dramatique, il est possible qu'elle s'associe en oligomères et se structure. Dans cette partie, nous avons donc cherché à déterminer si la protéine interagissait en cis et cela pour deux compositions de membrane différentes. Une composition permettait la formation de microdomaines et l'autre non. Pour étudier l'oligomérisation de GL1, nous avons dans un premier temps analysé sa dynamique sur la membrane.

5.2.1 Le coefficient de diffusion : un indicateur de l'état d'oligomérisation

La membrane est fluide comme nous l'avons vu dans la partie 1.2.2, les lipides diffusent donc dans la membrane tout comme la plupart des molécules qui y sont incorporées. La mesure du coefficient de diffusion d'objets insérés dans la membrane peut se faire via des mesures de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) dont nous détaillerons le principe dans la partie suivante.

L'étude de la diffusion d'objets de différentes tailles incorporés dans la membrane a révélé que leur vitesse de diffusion dépendait essentiellement de la taille de leur partie hydrophobe insérée dans la bicouche [89]. Gambin a synthétisé des peptides (L_{12}) pouvant être considérées comme un modèle des hélices α insérées dans une membrane. Puis des streptavidines solubles ont été liées à la tête des peptides ($S-L_{12}$), cette molécule supplémentaire reste donc à l'extérieure de la bicouche. Pour certaines concentrations en peptides (L_{12}) et en streptavidine, les streptavidines s'associent et forment des dimères stables ($S-2L_{12}$). Les mesures des coefficients de diffusion des molécules L_{12} , $S-L_{12}$ et $S-2L_{12}$ ont donné une valeur identique pour les peptides L_{12} et $S-L_{12}$ et une valeur plus faible pour $S-2L_{12}$ (Fig. 5.7). Ces résultats montrent que le coefficient de diffusion d'un objet inséré dans la membrane ne dépend que de la taille de sa partie hydrophobe. Ensuite les coefficients de diffusion de trois protéines, deux β -barrel, OmpA et OprM, et la protéine BR ont été mesurés afin de déterminer une dépendance de la diffusion avec le rayon R de la partie trans-membranaire (Fig. 5.7).

Les mesures effectuées sur les protéines montrent une variation du coefficient de diffusion en $1/R$. Le rayon du peptide L_{12} (5,5 Å) est comparable à celui d'un lipide, le coefficient de diffusion d'un lipide dans une membrane est donc d'environ $4,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Cette valeur est confirmée par d'autres études, elle peut cependant varier avec la composition lipidique de la bicouche et notamment si la bicouche se structure en phase liquide ordonnée ou gel.

Dans le but d'observer la diffusion des lipides dans des phases de différentes compositions et structures, des GUVs avec des microdomaines ont été formées avec deux lipides fluorescents DHPE-TexasRed et DHPE-OregonGreen. Le DHPE-TexasRed se ségrégait dans la phase liquide désordonnée et le DHPE-OregonGreen dans la phase liquide ordonnée (Fig. 5.8.A). Nous ne savons pas pourquoi ces deux lipides

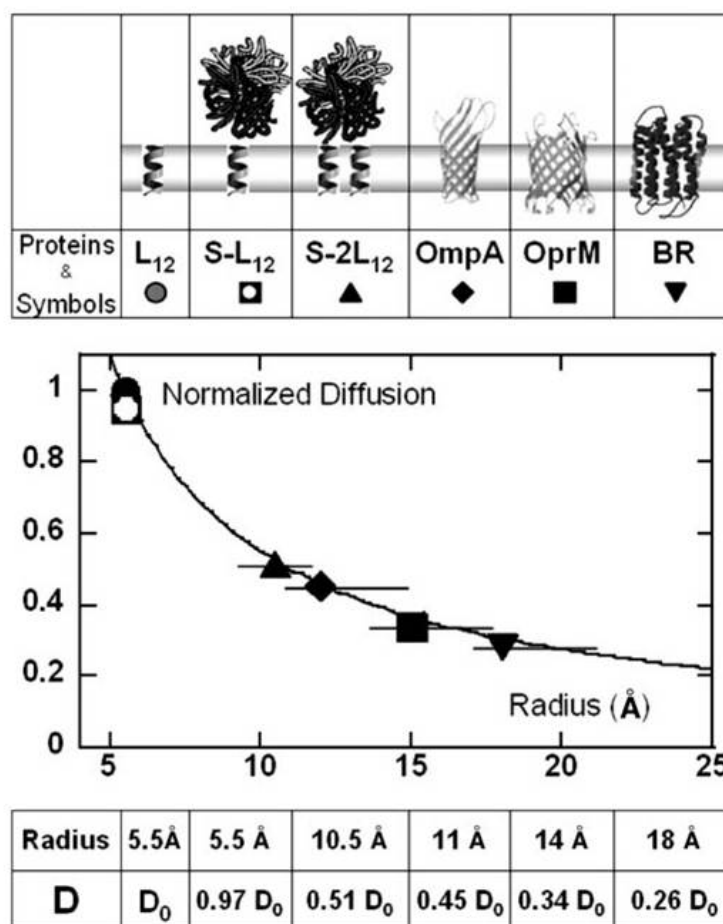


FIGURE 5.7: **Diffusion de protéines insérées dans une membrane.** Schéma des protéines insérées dans la membrane. Graphique des coefficients de diffusion de chaque protéine normalisés sur celui de L_{12} , $D_0 = 4,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, en fonction du rayon R de leur partie trans-membranaire. Tableau des rayons R de chaque protéine et des coefficients de diffusion correspondant mesurés exprimés en multiple de D_0 . [89].

fluorescents se partitionnent dans des phases différentes alors que les lipides sur lesquels ils sont fixés sont les mêmes, malgré cette zone d'ombre nous pensons que ces lipides peuvent être représentatifs de la dynamique des lipides dans leur phase. En photoblanchissant les fluorophores du DHPE-TexasRed et du DHPE-OregonGreen sur un disque de $7 \mu\text{m}$ de diamètre, puis en observant le recouvrement de fluorescence dû à la diffusion des lipides, nous avons pu observer un recouvrement beaucoup plus lent du DHPE-OregonGreen par rapport au DHPE-TexasRed (Fig. 5.8.B). Ces observations s'expliquent par la différence de composition de chaque phase, la phase ordonnée étant riche en lipides saturés et cholestérol est donc beaucoup plus compact et visqueuse que la phase liquide désordonnée (voir 1.2.3).

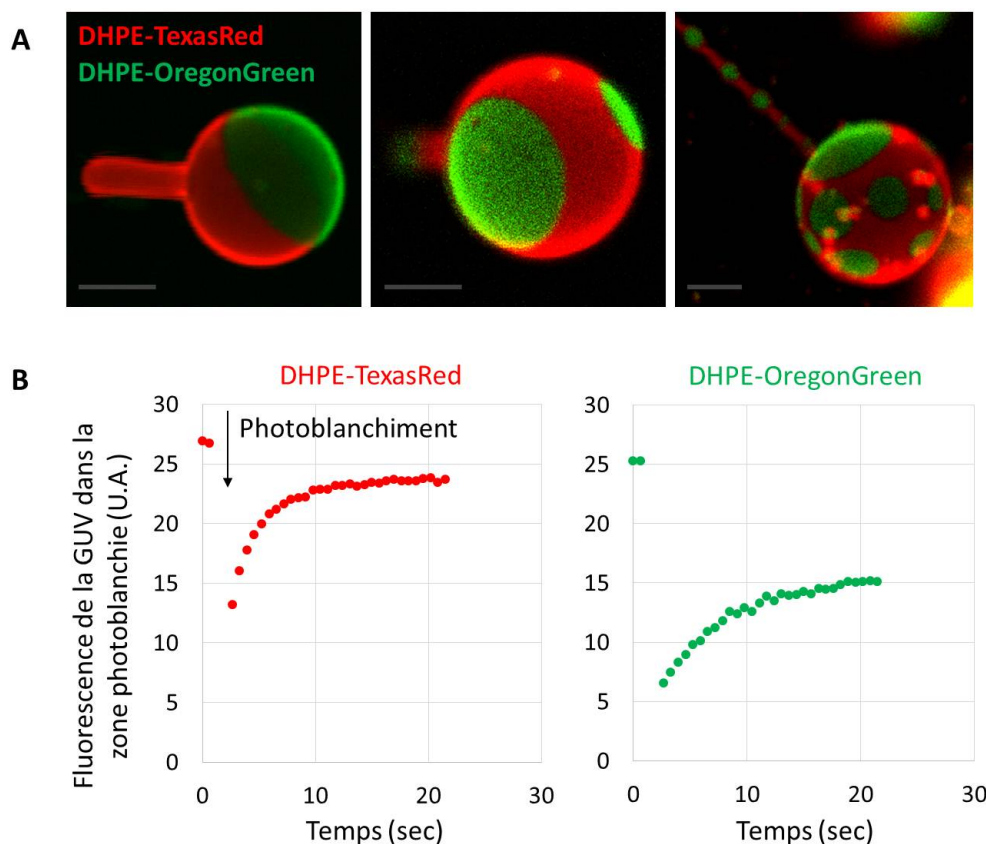


FIGURE 5.8: **Diffusion de lipides dans une phase liquide désordonnée et une phase liquide ordonnée.** Les GUVs ont été formées par la méthode du choc osmotique à 41 °C puis observées à température ambiante et micromanipulées, leur composition est la suivante : 30 mol% DOPE, 8,4 mol% DOPC, 40 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol, 0,8 mol% DHPE-TexasRed et 0,8 mol% DHPE-OregonGreen. **(A)** Le DHPE-TexasRed (rouge) se ségrège dans la phase liquide désordonnée et le DHPE-OregonGreen (vert) dans la phase liquide ordonnée. Image confocal en fluorescence. Bar d'échelle : 10 μm . **(B)** Graphiques montrant le recouvrement de fluorescence d'une zone (disque de 7 μm de diamètre) photoblanchie.

La protéine GL1 est une protéine périphérique. Son coefficient de diffusion sur une membrane devrait donc être proche de celui d'un lipide, si elle est monomérique. Si la protéine s'associe en oligomères, nous devrions alors observer une diminution de la valeur de son coefficient de diffusion. Il est important de rappeler que les fluorophores liés à la protéine GL1 : Alexa488 et YFP dont la taille est supérieure à celle de la protéine (30 KDa) n'influencent pas la diffusion de la protéine puisqu'ils sont à l'extérieur de la bicouche.

5.2.2 Mesure du coefficient de diffusion par la méthode du FRAP

Le coefficient de diffusion d'une molécule fluorescente incorporée dans une membrane peut se mesurer par des expériences de recouvrement de fluorescence après photo blanchiment (FRAP). Cette méthode consiste à photoblanchir le fluorophore des molécules étudiées sur une aire donnée puis à analyser le recouvrement de fluorescence sur cette même aire, dû à la diffusion de l'objet dans la bicouche (annexe I). Dans le cadre de nos expériences, nous avons réalisé nos mesures de FRAP sur des GUVs micromanipulées (Fig. 5.9.A) pour les maintenir immobiles (annexe H). La mise au point était faite sur un des pôles de la GUV afin de photoblanchir une surface (Fig. 5.9.B). Le signal fluorescent de la molécule étudiée, lipide ou protéine, est photoblanchi sur un disque puis l'intensité du signal fluorescent était enregistrée sur ce même disque au cours du temps (Fig. 5.9.C). La courbe de recouvrement permet d'établir un temps caractéristique (τ) défini en fonction du plateau et de la pente à l'origine de la courbe de recouvrement. τ peut s'écrire en fonction du diamètre du disque de membrane photoblanchi (d) et du coefficient de diffusion D de la molécule photoblanchie :

$$D = \frac{d^2}{16\tau} \quad (5.1)$$

Les expériences de FRAP furent réalisées sur des aires de diamètre d comprise entre 7 et 15 μm afin d'établir une courbe des τ en fonction de d^2 . Le coefficient directeur nous permet de calculer une valeur du coefficient de diffusion avec plus de précision.

5.2.3 Résultat et analyse

Les protéines GL1^{G116} et GL1^{G116C} ont été communément utilisées pour étudier l'activité de la protéine GL1. Dans le but de montrer, un comportement diffusif commun et une association potentielle en oligomères identiques, nous avons réalisé des expériences de FRAP sur GL1^{G116} et GL1^{G116C}. Dans ces premières expériences, les GUVs ont une phase liquide et les lipides sont tous insaturés. La composition des GL1^{G116}-PE GUVs est 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC et 1 mol% DOPE-ATTO647 et la composition des GL1^{G116C}-PE GUVs est 2 mol%

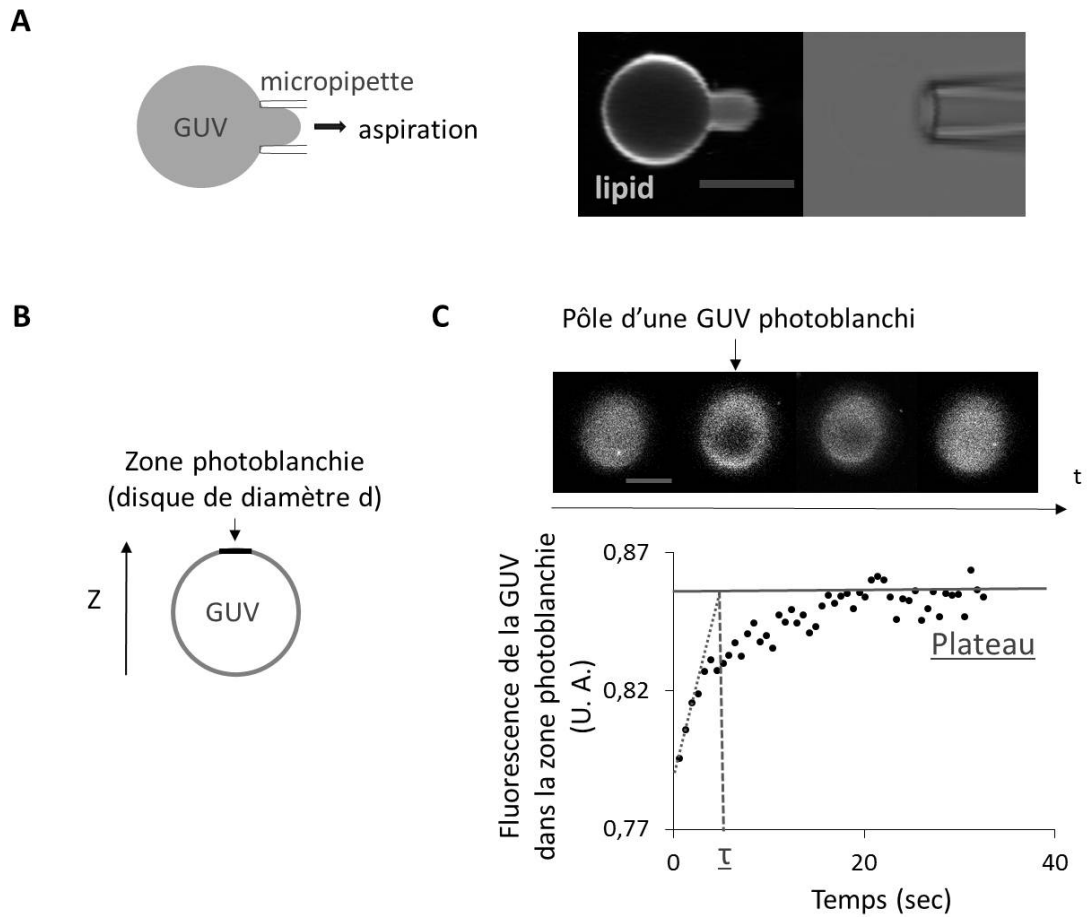


FIGURE 5.9: **Mesure du coefficient de diffusion par la méthode du FRAP.** (A) A gauche un schéma d'une GUV maintenue en position statique par aspiration avec une micropipette. A droite, photo d'une GUV en fluorescence (ATTO647) et en transmission aspirée par une micropipette. Image confocale, bar d'échelle : 10 μm . (B) Schéma d'une GUV indiquant la zone photoblanchie au pôle. (C) Image du pôle d'une GUV photoblanchie sur un disque de 10 μm de diamètre, au cours du temps. Graphique du recouvrement de fluorescence du lipide ATTO647 sur un disque de membrane de 10 μm de diamètre. Image confocale en fluorescence (ATTO647), barre d'échelle 10 μm .

DOPE-maléimide, 10 mol% POPS et 88 mol% DOPC. Les coefficients de diffusion mesurés sont les suivants $4.4 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour GL1^{G116} et $4.4 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour $\text{GL1}^{\text{G116C}}$ (Fig. 5.10.A). En parallèle, les coefficients de diffusion de deux lipides fluorescents ont été mesurés, $7.5 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour le DOPE-NBD incorporé dans des GUVs de composition 89 mol% DOPC, 10 mol% DOPS, 1 mol% DOPE-NBD, et $6.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour le DOPE-ATTO647 incorporé dans des GUVs de composition 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC et 1 mol% DOPE-ATTO647 (Fig. 5.10.A). Les coefficients de diffusion de GL1^{G116} et $\text{GL1}^{\text{G116C}}$ sont

similaires, elles ont donc un comportement diffusif commun. Leur coefficient de diffusion comparé à celui des lipides est légèrement plus faible ce qui suggère un état monomérique ou faiblement oligomérisé de la protéine ancrée sur la membrane. Les deux protéines ayant un comportement diffusif similaire nous nous bornerons dans la suite de notre étude à l'utilisation de GL1^{G116} qui se rapproche le plus du système *in vivo*.

La cinétique de diffusion de GL1^{G116} a ensuite été mesurée sur des GUVs présentant deux phases liquides (30 mol% DOPE, 9 mol% DOPC, 40 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647). Les protéines étant ancrées sur des lipides DOPE, elles étaient donc ségréguées dans la phase liquide désordonnée. En conséquence, la zone choisie pour photoblanchir la protéine ou le lipide devait se situer dans cette phase, ce qui représentait une difficulté car les domaines étaient mobiles. Les coefficients de diffusion mesurés sont $4.6 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour GL1^{G116} et $3.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour le lipide fluorescent (Fig. 5.10.B). Le coefficient de diffusion de la protéine est quasiment identique à celui trouvé précédemment sur les membranes avec une phase liquide alors que celui du lipide a diminué. Cela peut s'expliquer par une sorte d'oligomérisation des lipides dans la phase liquide désordonnée mais nous ne pouvons pas l'affirmer. La diffusion de la protéine et du lipide fluorescent sont comparables ce qui confirme un état monomérique ou faiblement oligomérisé de la protéine.

L'analyse des coefficients de diffusion des protéines GL1^{G116} et GL1^{G116C} suggère un comportement monomérique ou faiblement oligomérisé des protéines et cela indépendamment des deux compositions membranaires testées (Fig. 5.10.C). Ces résultats confirment des observations faites sur des GUVs Atg8-PE qui montrent un recouvrement de fluorescence similaire de la protéine et des lipides à l'issue d'une expérience de FRAP [70]. Afin de déceler la présence ou non de petits oligomères de protéines GL1^{G116}-PE, nous allons effectuer une expérience supplémentaire de photoblanchiment par palier que nous expliquerons dans la prochaine partie.

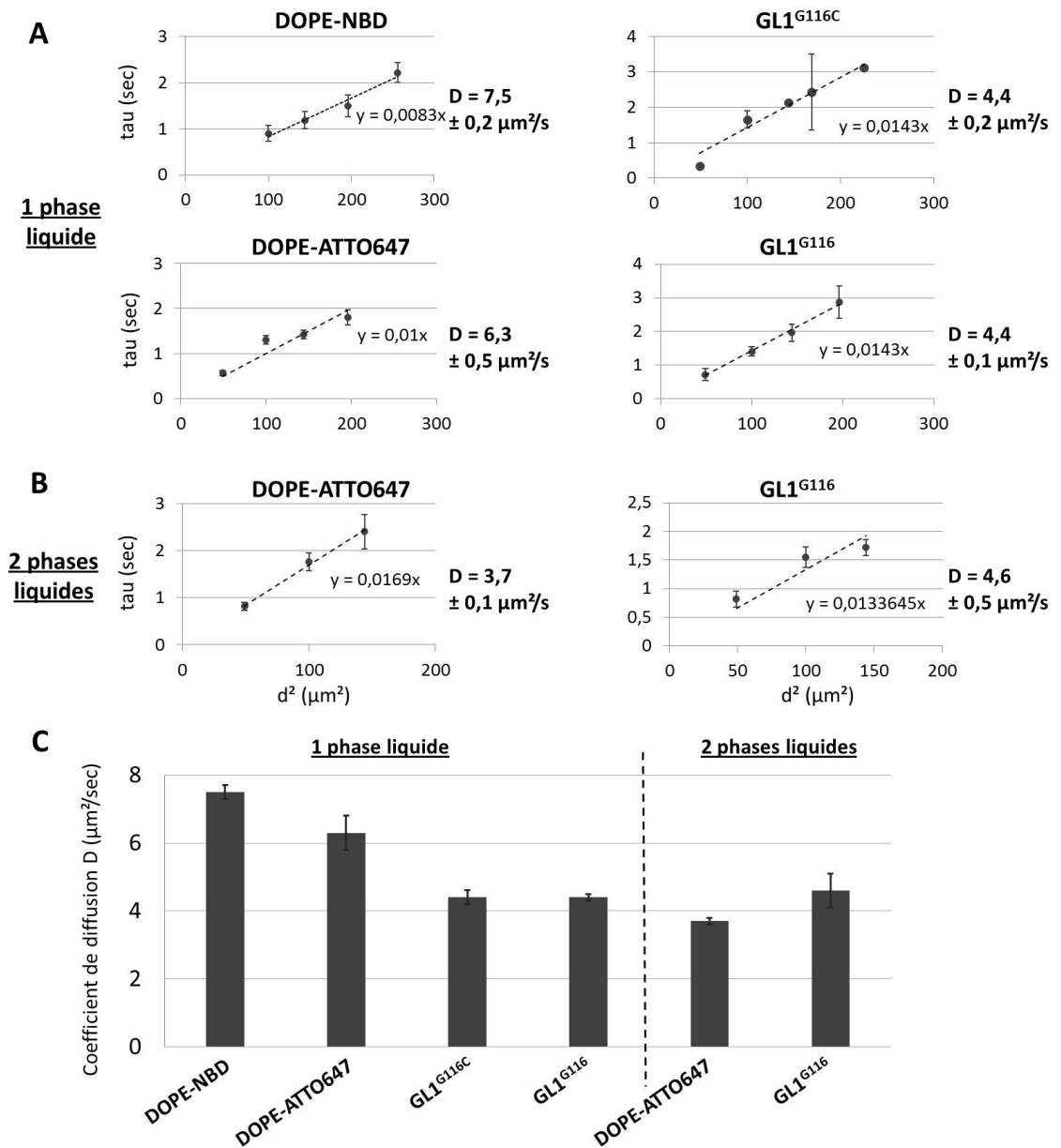


FIGURE 5.10: Coefficients de diffusion de GL1^{G116} et GL1^{G116C}. (A) Graphique des coefficients taux de recouvrement en fonction du diamètre au carré de l'aire de membrane photoblanchie pour la DOPE-NBD, DOPE-ATTO647, GL1^{G116} et GL1^{G116C} sur des membranes sans microdomaines. Les coefficients de diffusion correspondant sont écrits à la droite du graphique. (B) Graphique des coefficients taux de recouvrement en fonction du diamètre au carré de l'aire de membrane photoblanchie pour la DOPE-ATTO647 et GL1^{G116} sur des membranes avec des microdomaines. Les coefficients de diffusion correspondant sont écrits à la droite du graphique. (C) Récapitulatif de l'ensemble des coefficients de diffusion mesurés.

5.3 GL1 est monomérique ou faiblement oligomérisé sur la membrane

5.3.1 Technique photoblanchiment par palier

La technique de photoblanchiment par palier permet de déterminer avec précision le nombre de molécules fluorescentes dans un ensemble. L'observation d'un fluorophore conduit à un moment donné à son photoblanchiment et la probabilité que deux fluorophores photoblanchissent en même temps est faible. En conséquence, la courbe de photoblanchiment d'un ensemble de fluorophores au cours du temps s'effectue par palier. Et en décomptant le nombre de paliers, on peut retrouver le nombre de molécules fluorescentes présentes dans l'ensemble observé.

L'observation de la courbe de photoblanchiment d'un oligomère de protéines GL1^{G116}-PE ancré dans une membrane nous permettra de définir l'état d'oligomérisation de la protéine. Cette expérience a été menée sur des GL1^{G116}-PE liposomes ayant la composition suivante : 30 mol% DOPE et 70 mol% DOPC, nous n'avons pas répété l'expérience pour la composition lipidique donnant des domaines sur les membranes (30 mol% DOPE, 9 mol% DOPC, 40 mol% DPPC, 20 mol% cholestérol et 1 mol% DOPE-ATTO647) puisque les mesures de FRAP montrent un état légèrement oligomérisé de la protéine similaire pour ces deux compositions. Deux problèmes se posent dans la réalisation de cette expérience, le premier est d'isoler les oligomères les uns par rapport aux autres et le second est le taux de labélisation faible de la protéine qui biaise nos mesures en limitant la visibilité des multimères.

Afin d'isoler les oligomères de GL1^{G116}, nous avons tout d'abord réhydraté un film de lipides DOPC avec une solution contenant des petits liposomes GL1^{G116}-PE, afin d'atteindre un rapport final GL1/lipides de 1/10⁹. Nous supposons que les GL1^{G116} associés en oligomères forment des liens suffisamment forts pour résister au choc du mixage et maintenir leurs associations après dilution sur une plus grande surface de membrane. Le but recherché par cette dilution est de ne pas avoir plus d'un oligomère par liposome. Puis les liposomes GL1^{G116}-PE sont dilués dans du buffer et répandus sur une lamelle de verre où ils éclatent et forment une bicouche (Fig. 5.11). Cette dernière étape doit permettre de visualiser chaque oligomère par des points fluorescents distincts les uns des autres par observation

au microscope TIRF. Le détail des concentrations et des facteurs de dilution sont donnés en annexe J.

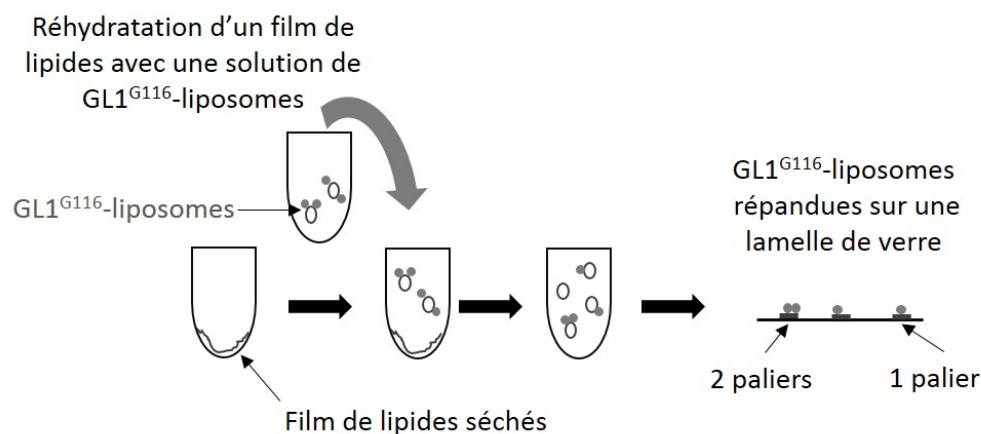


FIGURE 5.11: **Photoblanchiment par paliers.** Schéma de la technique du photoblanchiment par paliers. Un film de lipide séché est réhydraté avec une solution de GL1^{G116}-PE liposomes diluée. Après mixage, chaque liposome ne doit pas contenir plus d'un oligomère de de protéine GL1^{G116}. Les GL1^{G116}-PE liposomes sont ensuite répandus sur une lamelle de verre sur laquelle ils s'éclatent. Les oligomères doivent être spatialement suffisamment écartés pour que nous puissions les distinguer comme des points fluorescent.

5.3.2 Mesures et analyses

L'analyse de l'extinction des protéines GL1^{G116}-PE fluorescentes, nous indique que dans 87 % des cas la particule observée contient un fluorophore, le reste en comptant deux (Fig. 5.12) (le détail des analyses est donné en annexe J). Sachant qu'environ 1 protéine sur 20 est marquée, il faut prendre en compte les probabilités que les protéines fluorescentes observées soient associées avec une ou des protéines non marquées. Nous avons alors calculé les probabilités associées à l'observation d'un N-mère si celui-ci contenait n protéines marquées (avec n compris entre 1 et N). Ces résultats variaient beaucoup avec le taux de marquage que nous n'avions pas pu déterminer précisément, nous ne pouvions donc pas définir avec précision l'état d'oligomérisation de GL1. Toutefois, nous pouvons présumer de ces résultats un état faiblement oligomérisé de la protéine

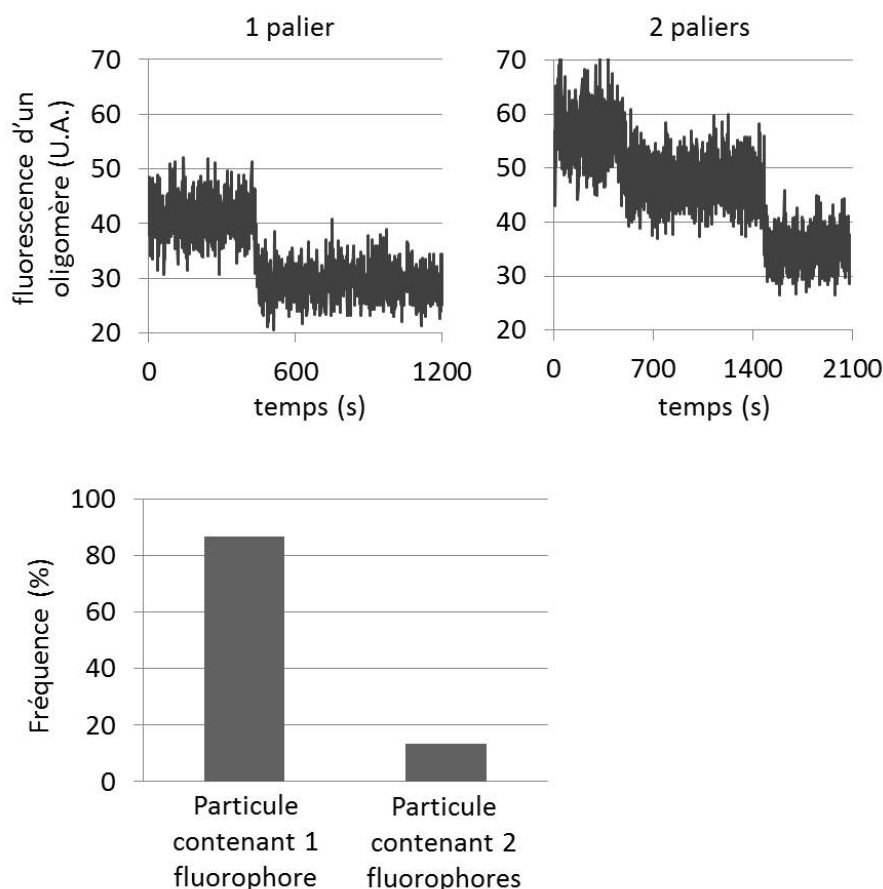


FIGURE 5.12: **Analyse des expériences de photoblanchiment par palier réalisées sur la protéine GL1^{G116}.** Les graphiques du haut donnent les exemples d'un oligomère photoblanchi contenant un fluorophore (gauche) et d'un oligomère photoblanchi contenant 2 fluorophores (droite). Le graphique du bas indique le pourcentage d'oligomères contenant un (87 %) et deux fluorophores (13 %), nous n'avons pas trouvé d'oligomères contenant plus de deux fluorophores.

Les expériences de photoblanchiment par palier et de FRAP ont montré un état monomérique ou faiblement oligomérisé de la protéine GL1 ancrée sur une membrane. La persistance de ce comportement dans différentes approches expérimentales et pour différentes compositions lipidiques des bicouches atteste qu'il est bien une propriété intrinsèque à la protéine GL1. Ces résultats semblent confirmer l'existence d'interactions en cis de la protéine qui était à ce jour fortement soupçonnée de par l'existence d'une potentielle conformation dite ouverte de la protéine [66] (voir 2.3.3) et l'observation d'association de protéines sur des petits liposomes (Fig. 5.13) [72].

Cette étude tend à montrer que sur l'autophagosome en formation, GL1 diffuse

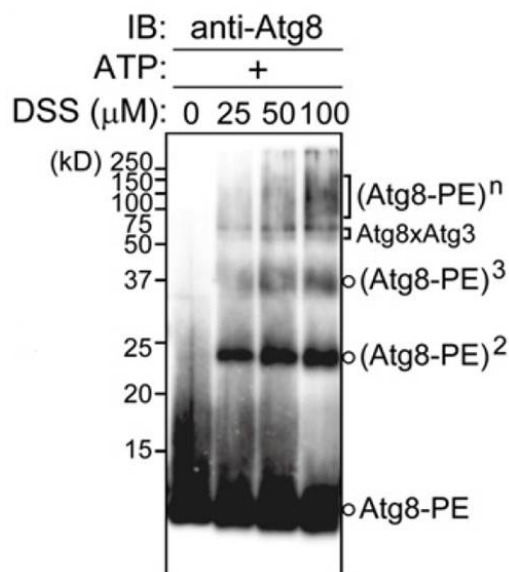
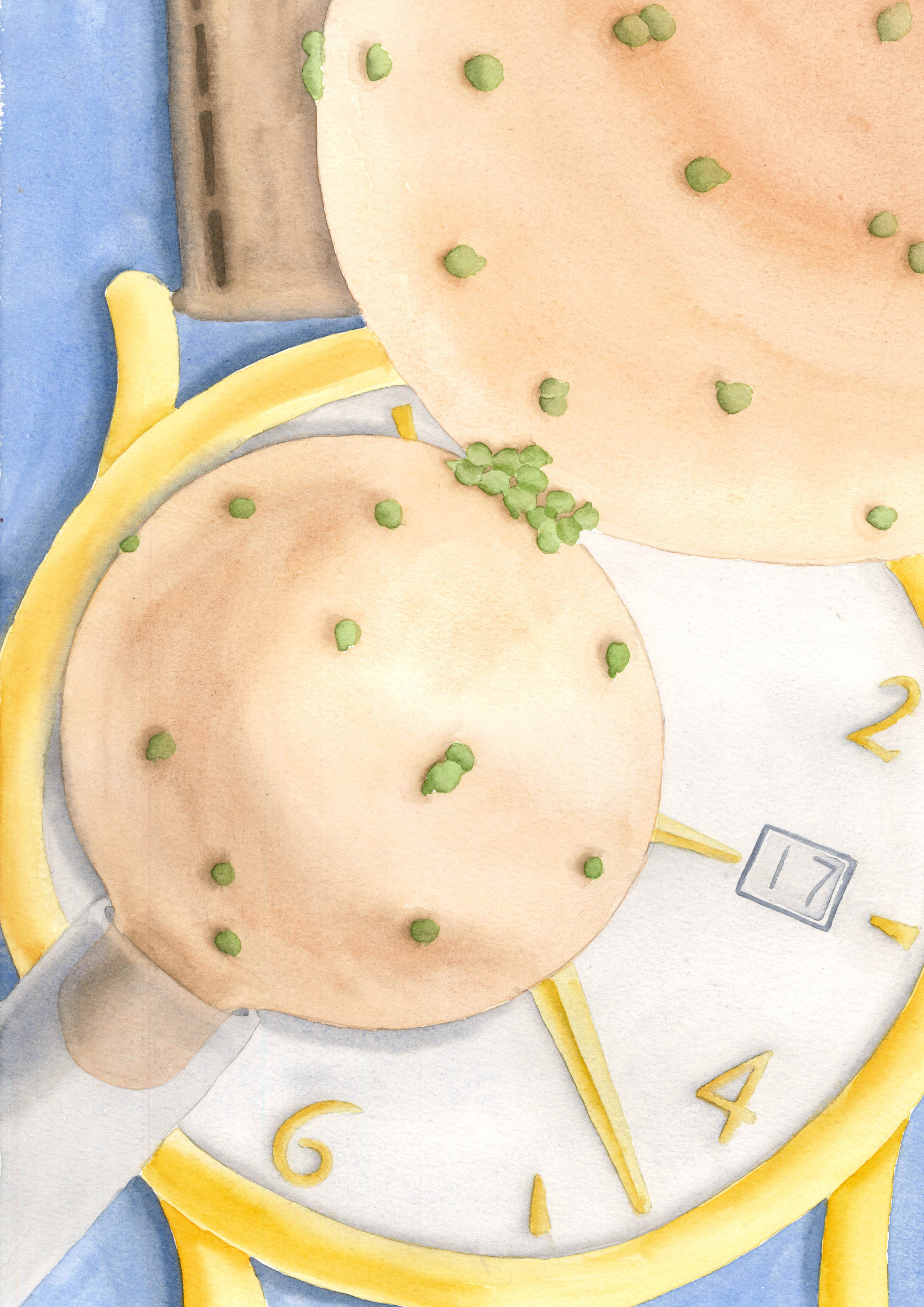


FIGURE 5.13: **Multimérisation d'Atg8.** Des liposomes Atg8-PE ont été incubés avec de la DSS (un crosslinker lysine-lysine) afin de révéler la présence d'oligomère d'Atg8 en réalisant ensuite un gel. Une bande très marquée est visible au niveau de 14 KDa, à cet endroit la protéine est monomérique. Une autre bande plus légère est visible vers 24 KDa, il s'agit d'homodimères d'Atg8-PE. D'autres bandes sont visibles plus haut qui correspondent à des n-mères d'Atg8-PE. Cette expérience montre que la protéine s'oligomérisse néanmoins nous ne savons pas si ces associations ont lieu en cis ou en trans. Extrait de [72].

en monomères et petits oligomères sur des régions de membrane faiblement courbées qui se compare le mieux à la courbure d'une GUV. Nous excluons les bords très courbés du PA car la courbure pourrait intervenir dans la distribution et la diffusion de la protéine, ce point sera développé dans le chapitre 7 [73, 90].



Chapitre 6

Association homotypique de GL1 en trans et absence de fusion membranaire

Dans le chapitre précédent nous avons étudié les interactions en cis de la protéine GL1 sur des membranes de faible courbure. A présent nous allons étudier les interactions en trans de la protéine. Une étape clef de la formation de l'autophagosome est la fermeture du PA. Or dans des organismes n'exprimant pas la protéine GL1, le nombre de PAs ouverts augmente (voir [2.3.2](#)). La protéine GL1 intervient donc peut-être dans la fermeture du pore de l'autophagosome en permettant l'adhésion puis la fusion de ses bords. Comme nous l'avons vu précédemment (voir [3.4](#)), le rôle de GL1 dans l'adhésion des membranes est avéré cependant nous ignorons encore la nature de cette adhésion, si elle est due à une interaction homotypique GL1-GL1 ou bien lipide protéine. Nous nous proposons donc par une expérience de micromanipulation de GUVs, de déterminer la nature de cette interaction en trans. Puis au travers de cette même expérience, nous étudierons l'éventualité que GL1 induise la fusion membranaire.

Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord le dispositif expérimental puis nous quantifierons le recrutement de la protéine GL1 dans la zone de contact de deux GUVs afin de déterminer la nature de l'interaction en trans de la protéine. Enfin, nous étudierons la fusion membranaire.

6.1 Dispositif expérimental

La micromanipulation de deux GUVs de composition contrôlée en protéines suivie de leur mise en contact forcée, nous permettra de définir la nature de l'interaction en trans de la protéine GL1. La composition lipidique des membranes correspond à celle décrite dans la partie V et présente une phase liquide unique : 69 mol% DOPC, 30 mol% DOPE et 1 mol% DOPE-ATTO647 ou DOPE-Rhodamine. Ces expériences seront réalisées uniquement sur la protéine GUVs GL1^{G116}, car elle est plus proche du système *in vivo* que GL1^{G116C}. Et aussi en raison du marqueur lié au N-terminal de la protéine qui pourrait perturber les mesures sur l'interaction en trans, nous avons supposé que la molécule Alexa 488 qui est petite perturberait moins les mesures que l'YFP de masse molaire 30 KDa.

Des GUVs GL1^{G116}-PE contenant 1 mol% de DOPE-Rhodamine et des GUVs GL1^{G116}-PE contenant 1 mol% de DOPE-ATTO647 ont été préparées par la méthode du choc osmotique simultanément sur la même lamelle de verre (Fig. 6.1). Les gouttes de liposomes GL1^{G116}-PE étaient déposées à environ 0,5 cm d'écartement. Elles étaient ensuite réhydratées dans des gouttes indépendantes afin qu'il n'y ait pas d'échanges de lipides. Puis à la suite de la dernière réhydratation, du buffer dont l'osmolarité correspondait à celui des gouttes de GUVs GL1^{G116}-PE, était ajouté délicatement afin que les deux gouttes fusionnent. Deux micropipettes étaient ensuite utilisées, l'une pour aspirer une GUV GL1^{G116}-PE avec de la rhodamine l'autre pour aspirer une GUV GL1^{G116}-PE avec de l'ATTO647. Les deux GUVs étaient mises ensuite en contact pour une durée de 1 à 10 minutes.

En parallèle, une expérience quasi identique était réalisée, une GUV GL1^{G116}-PE avec de l'ATTO647 était mise en contact avec une GUV sans protéine contenant de la rhodamine. Une interaction en trans de GL1 donnerait lieu un enrichissement de la protéine dans la zone de contact et donc à une augmentation de son signal fluorescent. A la suite du contact, les GUVs sont séparées et un tube de membrane se forme de façon occasionnelle ainsi qu'un patch de protéines à l'extrémité du tube. Les analyses du signal fluorescent dans la zone de contact des GUVs et de la formation de patches de protéines seront données dans la partie suivante. La formation du tube sera discutée dans le prochain chapitre.

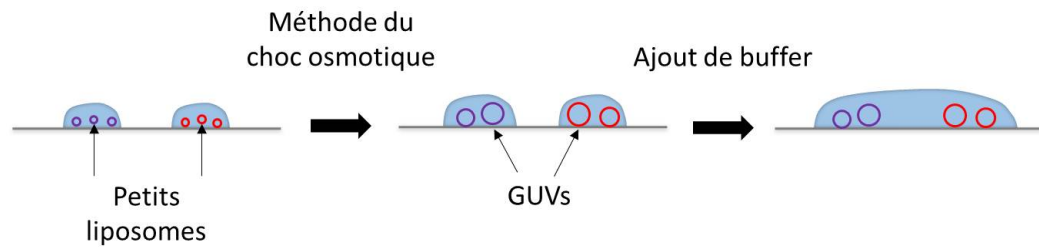


FIGURE 6.1: **Schéma de la préparation des expériences sur les interactions en trans.** Des gouttes de solution de petits liposomes de composition différente sont déposées sur une lamelle de verre. La méthode du choc osmotique est appliquée sur chacune de ces gouttes sans les mélanger. A la suite de la dernière hydratation, du buffer dont l'osmolarité correspond à celui des GUVs est ajouté délicatement pour faire fusionner les deux gouttes.

6.2 Quantification de l'association en trans de deux protéines GL1

6.2.1 Enrichissement de GL1 dans la zone de contact

La quantification de l'enrichissement de $GL1^{G116}$ dans la zone de contact entre deux GUVs a été effectuée en mesurant les signaux fluorescents de la protéine et des lipides dans la zone de contact et à l'extérieur de la zone de contact. Dans la zone de contact, l'intensité du signal fluorescent de la protéine $GL1^{G116}$, I^{zc}_{GL1} , a été mesurée en relevant le pic d'intensité le long d'une droite qui coupe la zone de contact, il en sera de même pour tous les signaux membranaires mesurés (Fig. 6.2). Sur les deux GUVs mises en contact, l'une sera nommée GUV1 et l'autre GUV2, l'intensité des signaux fluorescents des lipides dans la zone de contact sera donc désignée par les termes I^{zc}_{lip1} et I^{zc}_{lip2} . Les signaux fluorescents des lipides et des protéines sont aussi relevés sur la membrane des GUVs au voisinage de la zone de contact. Ceux des protéines sont annotés I^{GUV1}_{GL1} et I^{GUV2}_{GL1} , si $GL1^{G116}$ est présente sur les deux GUVs, sinon I^{GUV1}_{GL1} est le seul signal mesurable. Les signaux des lipides seront notés I^{GUV1}_{lip1} et I^{GUV2}_{lip2} . Afin de limiter l'effet de la polarisation du laser, nous avons choisi des zones spatialement proches à l'intérieur et à l'extérieur de la zone de contact pour mesurer les intensités du signal fluorescent. La mesure des intensités des signaux membranaires doit aussi prendre en compte le fond fluorescent propre à chaque GUV. Nous l'avons mesurée en relevant l'intensité moyenne le long d'une droite tracée à l'intérieur des GUVs. Dans

le cas de la protéine il sera noté I^{F1}_{GL1} et I^{F2}_{GL1} , et pour les lipides I^{F1}_{lip1} et I^{F2}_{lip2} (Fig. 6.2).

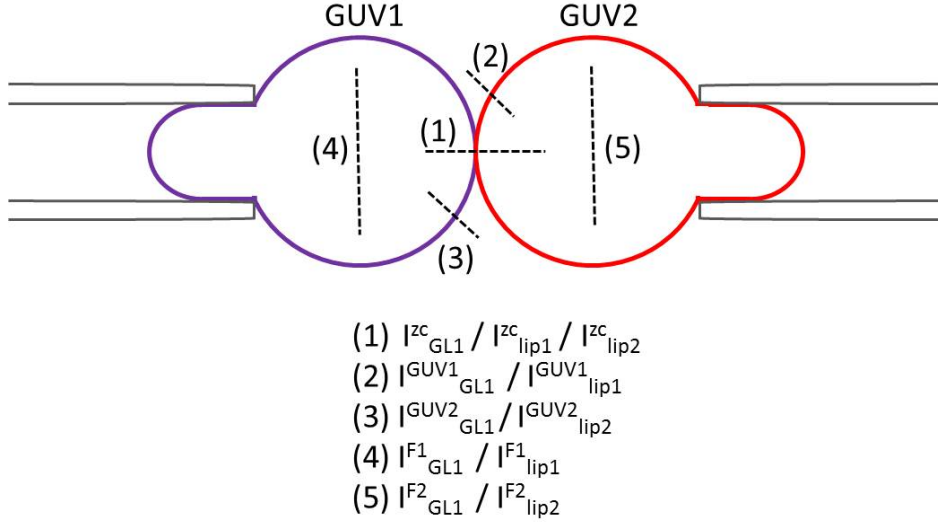


FIGURE 6.2: **Schéma de deux GUVs mises en contact par micromanipulation.** Les intensités de fluorescence sont mesurées le long des lignes pointillées. La ligne (1) coupe la zone de contact entre les deux GUVs et permet de mesurer I^{zc}_{GL1} , I^{zc}_{lip1} et I^{zc}_{lip2} . Les lignes (2) et (3) mesurent I^{GUV1}_{GL1} , I^{GUV1}_{lip1} , I^{GUV2}_{GL1} et I^{GUV2}_{lip2} . Les lignes (4) et (5) permettent de mesurer l'intensité de fluorescence du fond dans les GUVs pour la protéine et le lipide I^{F1}_{GL1} , I^{F1}_{lip1} , I^{F2}_{GL1} et I^{F2}_{lip2} .

Nous allons commencer par calculer l'enrichissement lors de mise en contact d'une GUV $GL1^{G116}$ -PE avec une GUV sans protéine (Fig. 6.3). S'il n'y a aucun enrichissement alors l'intensité du signal fluorescent de $GL1^{G116}$ divisée par l'intensité du signal fluorescent du lipide dans la zone de contact doit être égale à l'intensité du signal fluorescent de $GL1^{G116}$ divisée par l'intensité du signal fluorescent du lipide sur la membrane hors de la zone de contact :

$$\frac{I^{zc}_{GL1} - I^{F1}_{GL1}}{I^{zc}_{lip1} - I^{F1}_{lip1}} = \frac{I^{GUV1}_{GL1} - I^{F1}_{GL1}}{I^{GUV1}_{lip1} - I^{F1}_{lip1}} \quad (6.1)$$

La GUV sans la protéine était marquée avec le lipide fluorescent DOPE-rhodamine, or le signal émis par la rhodamine était visible dans la fenêtre d'observation de l'Alexa488, marqueur de la protéine, nous nommerons ce signal I^{GUV2}_{GL1*} . Nous avons donc retiré ce signal du signal de $GL1^{G116}$ dans la zone de contact, tout en prenant en compte la variation du signal du lipide ce qui ajoute un facteur multiplicatif :

$$\frac{I_{GL1}^{zc} - I_{GL1}^{F1} - \frac{(I_{GL1}^{GUV2} - I_{GL1}^{F2})(I_{lip2}^{zc} - I_{lip2}^{F2})}{I_{lip2}^{GUV2} - I_{lip2}^{F2}}}{I_{lip1}^{zc} - I_{lip1}^{F1}} = \frac{I_{GL1}^{GUV1} - I_{GL1}^{F1}}{I_{lip1}^{GUV1} - I_{lip1}^{F1}} \quad (6.2)$$

Le rapport de l'expression de gauche sur l'expression de droite doit donc être égal à 1 s'il n'y a pas d'enrichissement. Mais si la protéine s'enrichit dans la zone de contact alors ce rapport doit être supérieur à 1. Le calcul final du recrutement doit aussi prendre en compte l'ancrage de la protéine sur les deux parois de la GUVs, puisque les protéines sur la paroi interne n'interviennent pas le recrutement dans le feuillet externe est donc deux fois le recrutement observé. Le recrutement calculé sur une statistique de huit expériences et reporté en pourcentage est $-16 \pm 26 \%$ (Fig. 6.4). Il n'y a donc pas d'enrichissement significatif de GL1^{G116} dans la zone de contact entre deux GUVs si la protéine n'est présente que sur une GUV. Il semblerait donc qu'il n'y ait pas d'interaction en trans protéine lipide.

A présent, calculons l'enrichissement lors de mise en contact de deux GUVs GL1^{G116}-PE (Fig. 6.3). Nous allons réécrire l'expression (1) pour chacune des GUVs :

$$\frac{I_{GL1}^{zc} - I_{GL1}^{F1}}{I_{lip1}^{zc} - I_{lip1}^{F1}} = \frac{I_{GL1}^{GUV1} - I_{GL1}^{F1}}{I_{lip1}^{GUV1} - I_{lip1}^{F1}} \quad (6.3)$$

$$\frac{I_{GL2}^{zc} - I_{GL2}^{F2}}{I_{lip2}^{zc} - I_{lip2}^{F2}} = \frac{I_{GL2}^{GUV2} - I_{GL2}^{F2}}{I_{lip2}^{GUV2} - I_{lip2}^{F2}} \quad (6.4)$$

En sommant ces expressions nous obtenons :

$$I_{GL1}^{zc} - I_{GL1}^{F1} + I_{GL2}^{zc} - I_{GL2}^{F2} = \frac{I_{GL1}^{GUV1} - I_{GL1}^{F1}}{I_{lip1}^{GUV1} - I_{lip1}^{F1}}(I_{lip1}^{zc} - I_{lip1}^{F1}) + \frac{I_{GL2}^{GUV2} - I_{GL2}^{F2}}{I_{lip2}^{GUV2} - I_{lip2}^{F2}}(I_{lip2}^{zc} - I_{lip2}^{F2}) \quad (6.5)$$

Le rapport de l'expression de gauche sur l'expression de droite nous indique un enrichissement de la protéine dans la zone de contact si sa valeur est supérieure à 1. Des statistiques réalisées sur neuf expériences ont montré un enrichissement de la protéine dans la zone de contact de $80 \pm 41 \%$, ce qui indiquerait une interaction homotypique de la protéine GL1^{G116} (Fig. 6.4).

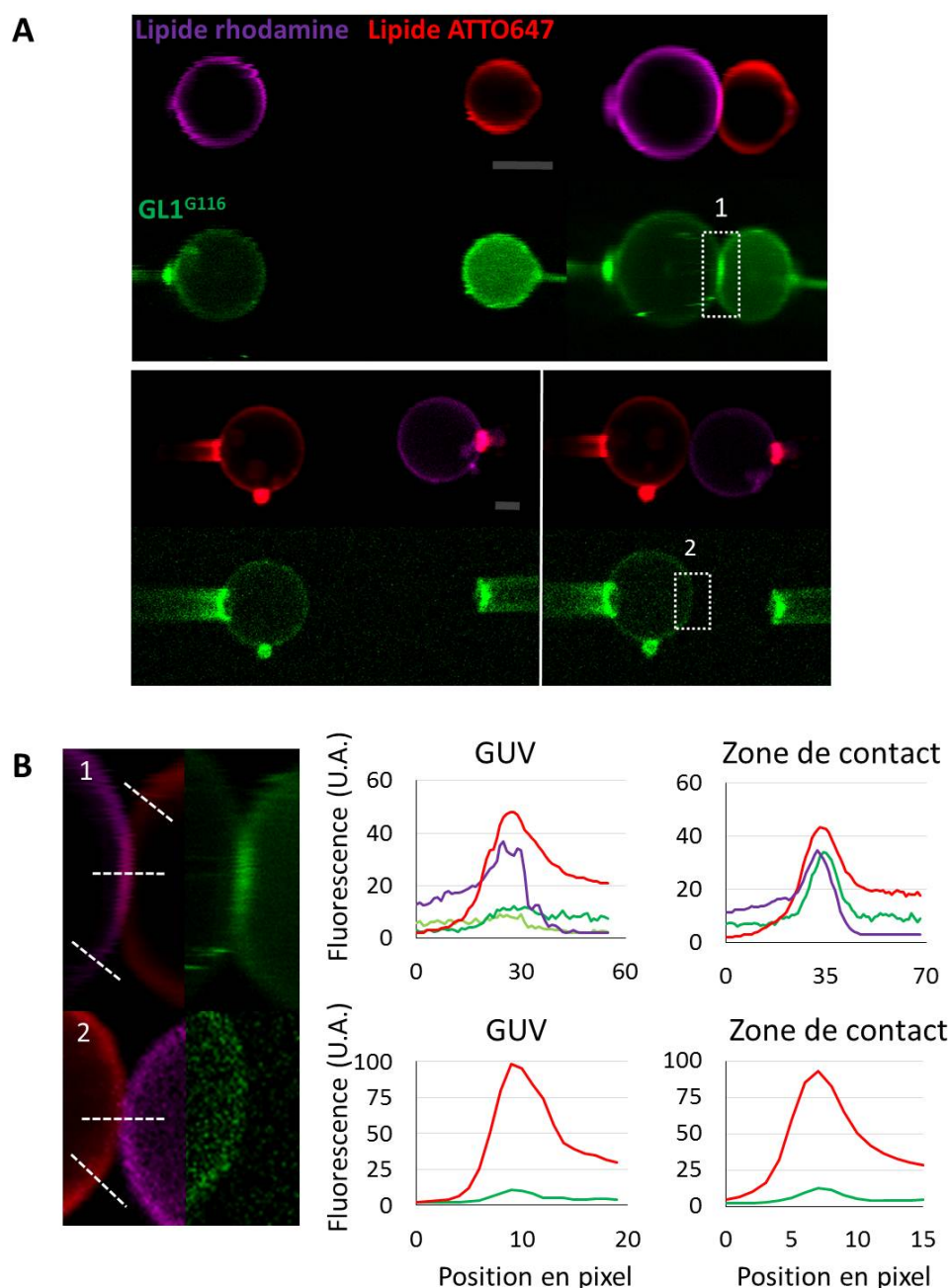


FIGURE 6.3: **Interaction en trans de la protéine GL1.** (A) GUVs micro-manipulées et mises en contact. Les photos sont prises en fluorescence lipide DOPE-ATTO647 (rouge), lipide DOPE-rhodamine (violet) et GL1 (Alexa 488, vert). Les photos du haut montrent la mise en contact de deux GUVs GL1^{G116}-PE et les photos du bas d'une GUV GL1^{G116}-PE mise en contact avec une GUV sans protéine. Image confocale, barre d'échelle : 10 μm . (B) Photos agrandies des zones 1 et 2 indiquées par un carré blanc pointillé sur les photos (A). Les graphiques montrent les intensités de fluorescence le long des lignes pointillées dans la zone de contact (gauche) et à l'extérieur de la zone de contact (GUV) (droite) dans le cas de figure de deux GUVs GL1^{G116}-PE mises en contact (haut) et dans le cas d'une GUV GL1^{G116}-PE mise en contact avec une GUV sans protéine (bas). Les intensités de fluorescence de GL1^{G116} correspondent aux courbes vertes, celles de la DOPE-rhodamine aux courbes violettes et celles de la DOPE-ATTO647 aux courbes rouges.

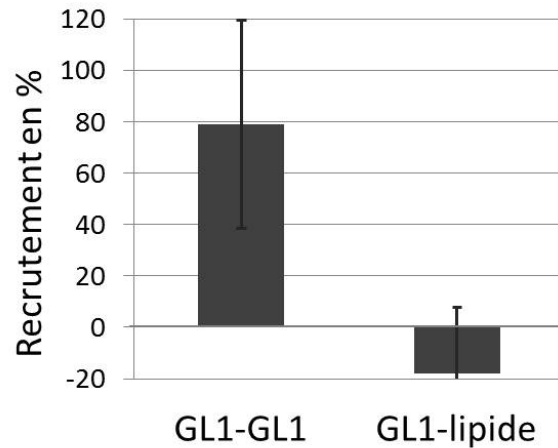


FIGURE 6.4: **Graphiques du pourcentage de recrutement.** Entre deux GUVs GL1^{G116}-PE mises en contact (GL1-GL1), statistique sur neuf expériences et pour une GUV GL1^{G116}-PE mise en contact avec une GUV sans protéine (GL1-lipide), statistique sur huit expériences.

L'enrichissement de la protéine Atg8 dans la zone de contact de deux petits liposomes a été estimé par Nakatogawa à environ 300 %, l'expérience est décrite dans la partie 3.4 (Fig. 3.9) [72]. Des expériences menées sur des GUVs Atg8-PE montrent un enrichissement de la protéine dans la zone de contact de deux GUVs de 50 à 100 % [73]. Nos résultats sur le calcul de l'enrichissement de la protéine GL1 dans la zone de contact de deux GUVs confirment donc ceux de Knorr. L'enrichissement plus élevé trouvé sur des petits liposomes est peut-être dû à la différence d'approche expérimentale et au très faible marquage de la protéine Atg8 aux particules d'or.

L'observation de l'absence de recrutement dans la zone de contact d'une GUV GL1-PE avec une GUV sans protéine, a prouvé une interaction homotypique de la protéine en trans. L'adhésion des membranes due à la protéine GL1 a donc lieu grâce à une association protéine – protéine. Lors de l'expansion du PA, le recrutement de membranes isolées est donc peut-être dû à une reconnaissance homotypique de la protéine présente sur les membranes. De même lors de sa fermeture, le pore du PA pourrait adhérer au niveau de ses bords par une reconnaissance protéine – protéine.

6.2.2 Analyse du patch de protéines GL1^{G116}-PE

Lors de la séparation des GUVs après leur mise en contact, un tube se formait occasionnellement et le plus souvent quand deux GL1^{G116}-PE GUVs étaient en présence. Une analyse détaillée de ces observations sera donnée dans le chapitre suivant. Ici, nous nous intéressons à l'accumulation persistante de GL1^{G116}-PE après la séparation des GUVs dans un patch situé à l'extrémité du tube (Fig. 6.5.A et B). Ce patch de protéines est observable dans 80 % des cas après contact de deux GL1^{G116}-PE GUVs et jamais après contact d'une GUV GL1^{G116}-PE avec une GUV sans protéine (Fig. 6.5.C). Ils sont très probablement constitués des protéines GL1^{G116}-PE accumulées dans la zone de contact lors de l'apposition des GUVs GL1^{G116}-PE. Les complexes de protéines formés en trans sont donc stables et maintiennent leurs associations malgré la séparation des GUVs. Ils sont alors forcés de se concentrer dans la zone de contact entre le tube et la GUV.

6.3 Absence de fusion membranaire

L'activité fusogénique des protéines Atg8/LC3 a été principalement étudiée sur des petits liposomes à travers des tests de fusion. Les résultats sont variables selon la composition des membranes et la protéine homologue impliquée, voir la partie 3.4. En effet, la fusion, l'hémifusion et l'absence de fusion des membranes ont été observées lorsque celles-ci portaient une des protéines de la famille Atg8/LC3 [72, 74, 75]. Nous avons donc cherché à déterminer par une approche expérimentale différente si la protéine GL1 causait l'hémifusion ou la fusion des membranes.

L'approche expérimentale employée est identique à celle utilisée pour les expériences sur les interactions en trans de la protéine. Deux GUVs GL1^{G116}-PE étaient micromanipulées et mises en contact pour un temps variant de 1 à 10 minutes. Leur composition était identique aux précédentes 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC et 1 mol% DOPE-rhodamine ou DOPE-ATTO647. Les GUVs GL1^{G116}-PE mises en contact contenaient un lipide fluorescent différent et si un pore s'ouvrait par hémifusion ou fusion des membranes au niveau de la zone de contact alors nous devions observer une diffusion des lipides fluorescents d'une GUV à l'autre. Toutefois, nous n'avons jamais observé d'échange de lipides d'une GUV à l'autre, il n'y aurait donc ni hémifusion ni fusion des membranes dues à la protéine GL1.

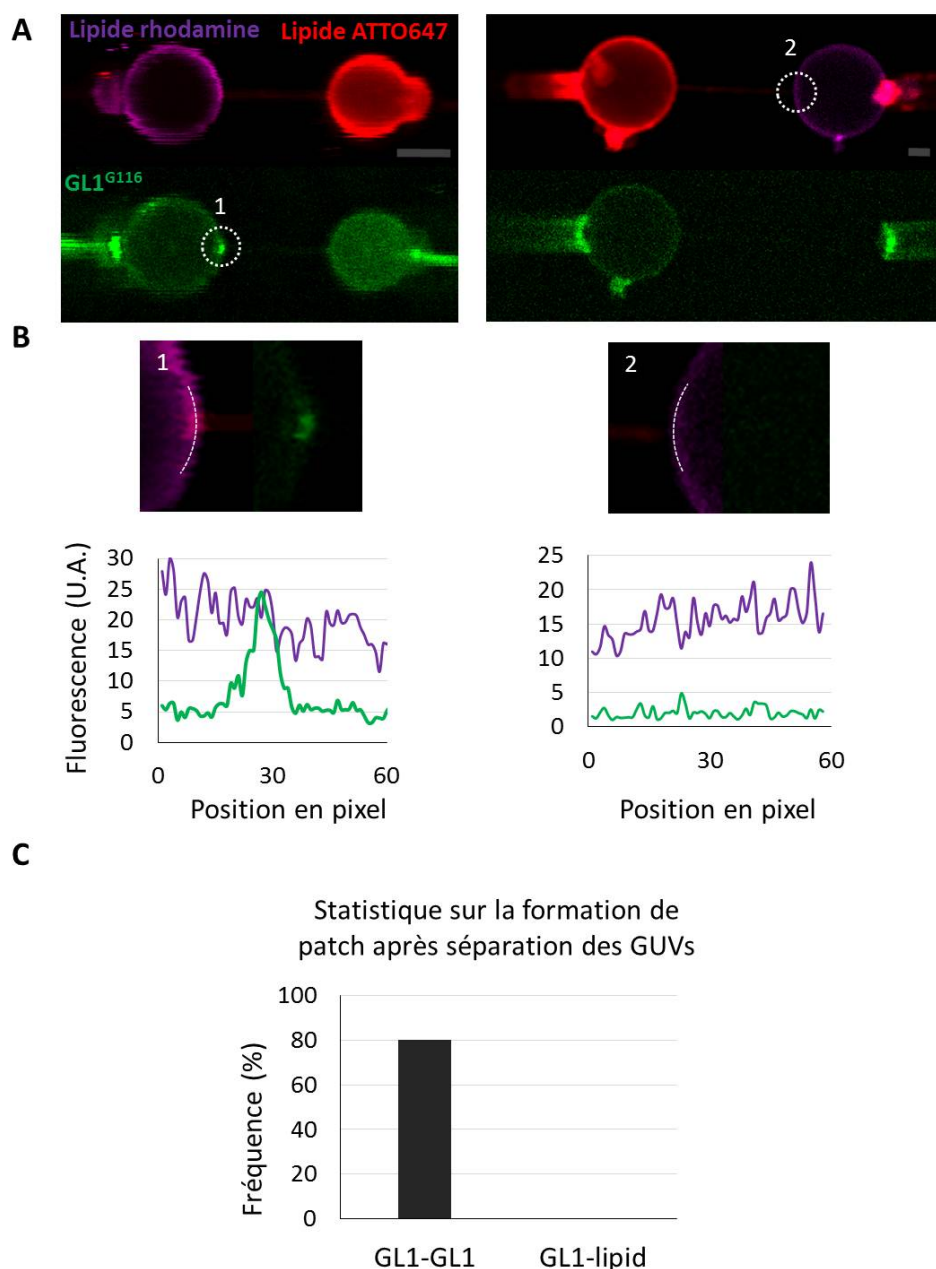


FIGURE 6.5: **Analyse du patch de protéines GL1^{G116}-PE.** (A) Les GUVs sont micromanipulées afin d'être mises en contact puis séparées. Les photos sont prises en fluorescence lipide DOPE-ATTO647 (rouge), lipide DOPE-rhodamine (violet) et GL1 (Alexa 488, vert). Les photos de gauche montrent deux GUVs GL1^{G116}-PE séparées après leur mise en contact et les photos de droite montrent une GUV GL1^{G116}-PE et une GUV sans protéine après leur séparation. Un patch de protéines GL1^{G116}-PE est visible à l'extrémité du tube formé entre les deux GUVs GL1^{G116}-PE. Image confocale, barre d'échelle : 10 μ m. (B) Photos agrandies des zones 1 et 2 indiquées par un cercle blanc pointillé sur les photos (A). Les graphiques montrent les intensités de fluorescence le long des lignes pointillées. Les intensités de fluorescence de (C) correspondent aux courbes vertes et celles de la DOPE-rhodamine aux courbes violettes. (C) Graphiques des pourcentages de patchs de protéines formées après séparation des GUVs, entre deux GUVs GL1^{G116}-PE (GL1-GL1) et entre une GUV GL1^{G116}-PE et une GUV sans protéine (GL1-lipide).

Néanmoins, le temps de diffusion des lipides ainsi que la taille d'ouverture du pore entre les GUVs peuvent constituer un facteur limitant à l'observation d'un échange de lipides. En effet, il est raisonnable de penser que l'ouverture d'un pore de très faible diamètre agirait comme un goulot d'étranglement et donc qu'un échange de lipide entre les GUVs aurait lieu lentement. De la même façon, une diffusion lente des lipides sur la membrane ralentit l'échange de lipides entre les GUVs. Il est donc possible que nos conditions d'expériences ne nous aient pas permis d'observer l'hémifusion ou la fusion des membranes si le pore ouvert était trop petit et notre temps d'observation trop court. En réutilisant un modèle de diffusion développé par Rubin et al. [91] et repris par Heuvingh, nous avons estimé le temps nécessaire à l'observation d'un échange de lipides fluorescents visible entre deux GUVs en fonction du temps d'observation et pour différentes tailles de pores ouverts.

Le modèle de Rubin modélise deux GUVs ayant hémifusionné ou fusionné par deux sphères tronquées collées l'une à l'autre (Fig. 6.6). Le rayon (R) des deux sphères est considéré identique et la taille du pore ouvert est caractérisée par l'angle θ_0 formé par l'axe de la cacahouète avec le bord du pore.

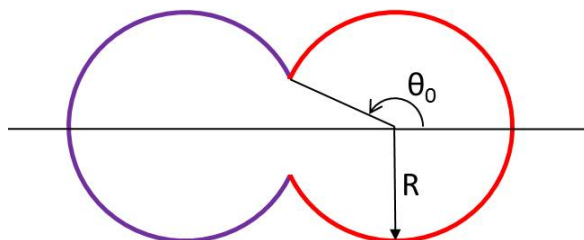


FIGURE 6.6: Schéma du modèle de Rubin.

Un rapport de fluorescence ($R(t)$) a été établi entre deux points symétriques sur les deux GUVs en fonction du temps, le détail des calculs se trouvent dans la thèse de Julien Heuvingh (Fig. 6.7). En considérant qu'au temps t_0 , tous les lipides fluorescents sont sur une GUV alors le rapport $R(t_0)$ est nul. Dans le cas le plus lent, l'hémifusion, lorsque la concentration en lipides fluorescents s'équilibre sur les deux GUVs alors le rapport de fluorescence tend vers $1/3$. L'évolution du rapport de fluorescence dépend de la taille d'ouverture du pore et du coefficient de diffusion des lipides. Sur le graphique en figure (Fig. 6.7), le coefficient de diffusion a été fixé à $3,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, et l'angle θ_0 à $\pi/2$, $3\pi/4$, $11\pi/12$ et $99\pi/100$, ils correspondent à des ouvertures de rayon 10, 7.1, 2.6 et $0.33 \mu\text{m}$.

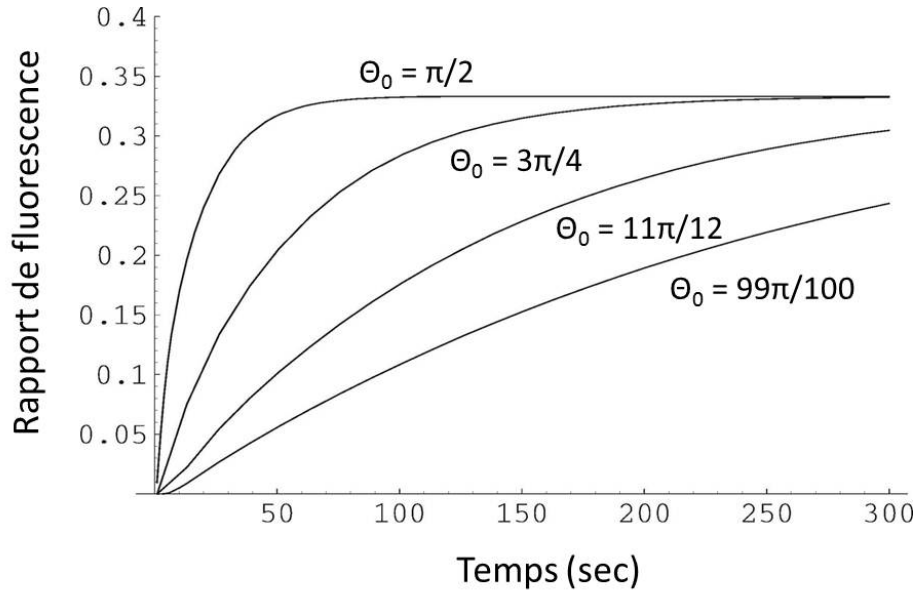


FIGURE 6.7: **courbes d'évolution théorique du rapport de fluorescence en fonction du temps.** Pour un couple de vésicules de $10\text{ }\mu\text{m}$ de rayon se rejoignant à des angles $\theta_0 = \pi/2, 3\pi/4, 11\pi/12$ et $99\pi/100$. Extrait de la thèse de Julien Heuvingh

Les GUVs GL1^{G116}-PE sont maintenues en contact au moins 5 minutes. Donc, d'après le graphique du rapport de fluorescence en fonction du temps, pour des pores ouverts d'une taille supérieure à $99\pi/100$, nous devrions observer un rapport de fluorescence supérieur à 0,2 et détectable au microscope. De plus sachant que le coefficient de diffusion de nos protéines, $4.4 \pm 0.1\text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$, est supérieur à celui utilisé dans ce modèle alors l'évolution de notre rapport de fluorescence devrait être encore plus rapide. En conclusion, au travers de nos expériences de micro-manipulation, nous n'observons ni hémifusion ni fusion des membranes due à la protéine GL1.



Chapitre 7

Effet du module de courbure et de la courbure de la membrane sur la répartition de GL1

Lors de l'étude de l'interaction en trans de la protéine GL1^{G116}–PE, nous avons observé une répartition inégale dans l'origine du tube tiré entre une GUV sans protéine et une GUV GL1^{G116}–PE. Le tube était extrait le plus souvent de la GUV GL1^{G116}–PE. Puisque, nous savons que la force nécessaire à l'extraction d'un tube est proportionnelle au module de courbure de la membrane, nous avons orienté nos recherches sur cette caractéristique physique d'une bicouche. Nous avons mesuré le module de courbure de la membrane d'une GUV avec et sans la protéine ancrée en employant la méthode décrite dans la partie 1.5.5. Puis nous nous sommes intéressés à l'effet de la courbure de la membrane sur la répartition de la protéine GL1. Nous avons achevé notre étude en proposant un modèle prévoyant le recrutement de la protéine en fonction de la taille du tube et donc de la courbure de la membrane.

Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord une analyse des expériences réalisées sur l'interaction en trans des protéines. Ensuite, les mesures du module de courbure des membranes des GUVs avec et sans la protéine ancrée seront détaillées. Puis, nous étudierons l'enrichissement de la protéine GL1 dans le tube de membrane. Enfin un modèle prévoyant le recrutement de la protéine dans le tube selon son rayon sera proposé.

7.1 Analyse de l'origine des tubes tirés dans le cadre de l'expérience sur les interactions en trans de GL1

Lors des mesures sur l'interaction en trans des protéines GL1^{G116}-PE, deux GUVs étaient micromanipulées, afin d'être mises en contact puis séparées. Quand les deux GUVs en présence portaient la protéine GL1, un tube se formait lors de la séparation dans 88 % des cas (statistique réalisée sur 25 adhésions), alors que si la protéine n'était présente que sur une GUV, un tube se formait dans 37 % des cas (statistique réalisée sur 19 adhésions) (Fig. 7.1.A). Enfin si la protéine n'était présente sur aucune des GUVs, aucun tube ne se formait (statistique réalisée sur 8 adhésions) (Fig. 7.1.A). La présence du tube elle-même n'est pas indicative d'une interaction en trans de GL1^{G116}. En effet, nous savons qu'il existe une adhésion naturelle des membranes entre elles, et la présence de la protéine GL1 peut faciliter la déformation de la membrane et donc indirectement permettre la formation du tube.

Une analyse plus fine des tubes formés entre une GUV GL1^{G116}-PE et une GUV sans protéine nous a permis de conforter cette hypothèse. En effet, dans 71 % des cas, le tube est tiré de la GUV GL1^{G116}-PE (statistique réalisée sur 7 tubes) (Fig. 7.1.B). Cette répartition inégale dans l'origine du tube suggère fortement que la présence de GL1^{G116} sur la membrane facilite sa déformation. Nous allons donc dans la partie suivante mesurer le module de courbure de la membrane d'une GUV avec et sans protéine.

7.2 Extraction d'un tube de membrane d'une GUV et mesure de son rayon

Une GUV contenant des lipides DSPE-biotine (0,5 mol%) est micromanipulée simultanément à une bille marquée à la streptavidine. Un contact de quelques secondes entre la GUV et la bille suffit à lier la streptavidine et la biotine. Puis en écartant la GUV de la bille, un tube de membrane de faible rayon se forme au niveau du contact (Fig. 7.2). Un protocole détaillé est fourni en annexe K.

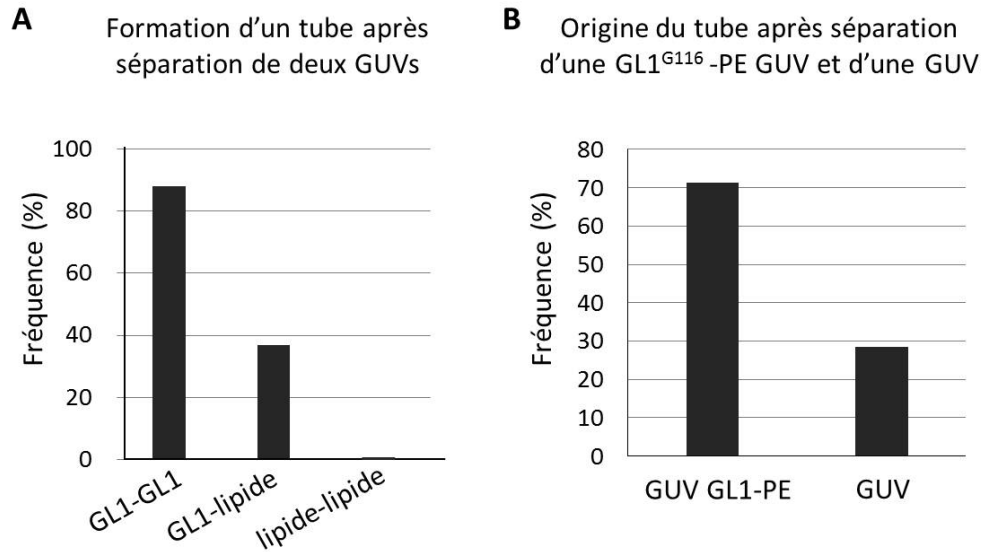


FIGURE 7.1: **Formation d'un tube après la séparation de deux GUVs mises en contact.** (A) Lors des expériences sur l'interaction en trans de la protéine GL1, les GUVs mises en contact étaient ensuite séparées. Un tube se formait entre les deux GUVs dans 88 % des cas lorsque la protéine était présente sur chaque membrane (GL1-GL1), statistique réalisée sur 25 adhésions, dans 37 % des cas si la protéine était ancrée sur seulement une membrane (GL1-lipide), statistique réalisée sur 19 adhésions, et jamais si la protéine n'était sur aucune membrane (lipide-lipide), statistique réalisée sur 8 adhésions. (B) Les tubes formés entre une GUV GL1^{G116}-PE et une GUV sans protéine est extrait dans 71 % des cas de la GUV GL1^{G116}-PE (GUV GL1-PE) et dans 29 % des cas de la GUV sans protéine (GUV), statistique réalisée sur 7 tubes.

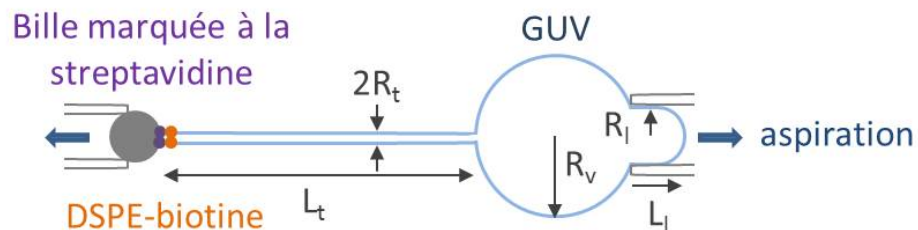


FIGURE 7.2: Schéma d'un tube de membrane extrait d'une GUV.

Afin de calculer le rayon du tube (R_t), la bille ou la GUV sont déplacées de façon à changer la longueur du tube (L_t). Puisque, la surface de la GUV est constante, la longueur de la langue (L_l) projetée dans la micropipette varie simultanément linéairement (Fig. 7.3). En connaissance de cette variation, du rayon de la vésicule (R_v) et de celui de la langue (R_l), nous pouvons calculer R_t [21] :

$$R_t = \frac{\Delta L_l}{\Delta L_t} \left(1 - \frac{R_l}{R_v}\right) R_l \quad (7.1)$$

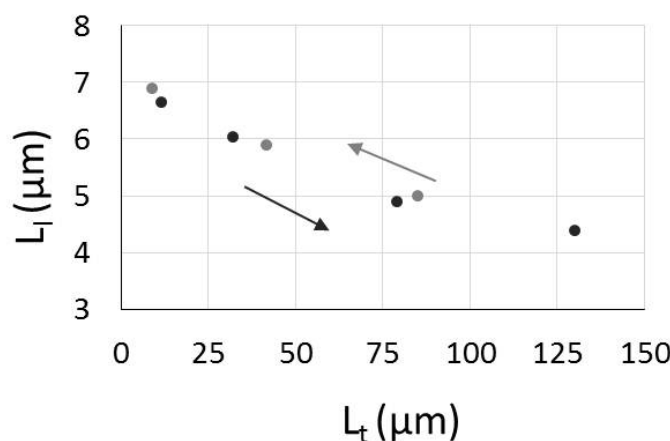


FIGURE 7.3: **Longueur de la langue projetée dans la micropipette en fonction de la longueur du tube de membrane.** La bille et la GUV sont d'abord écartées (points gris foncés) puis rapprochées (points gris claires). L'ensemble de ces points se fittent par une droite dont le coefficient directeur permet le calcul de R_t .

Le rayon du tube de membrane peut être modulé en variant la pression d'aspiration. Une augmentation de la pression permettrait d'obtenir des tubes de rayon plus faible.

7.3 Mesure du module de courbure d'une membrane avec et sans GL1^{G116} ancré

Le module de courbure (k) de la membrane d'une GUV et d'une GUV GL1^{G116}-PE a été mesuré selon la méthode développée dans la partie 1.5.5. Nous rappelons ici que le module de courbure est lié au rayon du tube (R_t) extrait et à la tension de la membrane (τ) par la relation suivante :

$$k = 2R_t^2\tau \quad (7.2)$$

Et la tension de la membrane s'écrit en fonction du rayon interne de la micropipette (R_p), la pression d'aspiration ($P - P_p$) et du rayon de la GUV (R_{GUV}) :

$$\tau = \frac{P - P_p}{2\left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_{GUV}}\right)} \quad (7.3)$$

La composition lipidique des GUVs est 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC et 1 mol% DOPE-ATTO647. Le module de courbure de la membrane d'une GUV sans protéine est $2,7 \cdot 10^{-19} \pm 3,8 \cdot 10^{-20}$ J, statistique réalisée sur dix GUVs (Fig. 7.4). Et le module de courbure de la membrane d'une GUV GL1^{G116}-PE est $1,6 \cdot 10^{-19} \pm 1,7 \cdot 10^{-20}$ J, statistique réalisée sur trois GUVs (Fig. 7.4).

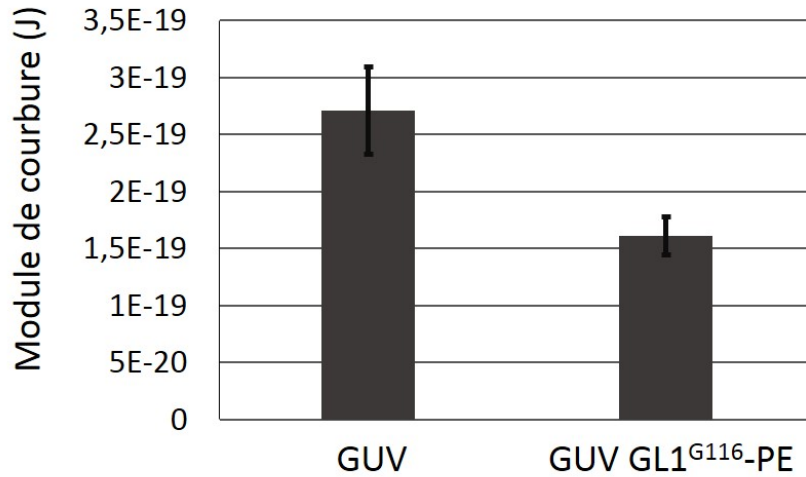


FIGURE 7.4: **Module de courbure de la membrane d'une GUV.** Le module de courbure de la membrane a été mesuré sur des GUVs GL1^{G116}-PE (statistique sur trois GUVs GL1^{G116}-PE) et sur des GUVs sans protéines (statistique sur dix GUVs GL1^{G116}-PE).

Ces mesures confirment nos hypothèses, l'ancrage de la protéine GL1 dans la membrane facilite la déformation de la membrane en abaissant son module de courbure. La présence de la protéine modifie donc une caractéristique physique de la bicouche. Il est encore difficile d'imaginer quel peut être exactement le rôle d'une telle propriété de la protéine sur la membrane du PA, en revanche nous avons fait

la supposition que cela affectait la distribution de la protéine sur la bicouche, nous développerons ce point dans la partie 7.5.

7.4 Recrutement de GL1 dans les zones les plus courbées de la membrane

La lipitation de la protéine GL1 nécessite une forte courbure de la membrane comme nous l'avons vu dans la partie 2.3.5. Nous nous sommes alors demandés si la courbure de la membrane continuait à jouer un rôle sur la protéine GL1 ancrée en affectant sa répartition dans l'hypothèse où le substrat présentait différentes courbures. En utilisant les expériences d'extraction de tube en micromanipulant des GUVs, nous pouvions obtenir une membrane avec deux régions de courbure significativement différentes et observer la répartition de la protéine sur cette membrane.

Les GUVs GL1^{G116}-PE utilisées avaient une composition lipidique identique à celle utilisée dans la partie précédente : 30 mol% DOPE, 69 mol% DOPC et 1 mol% DOPE-ATTO647. Les tubes de membrane extraits de ces GUVs avaient un rayon compris entre 15 nm et 37 nm, la mesure de leur rayon a été réalisée comme décrit dans la partie 7.2. Les GUVs mesuraient en moyenne 10 µm de rayon, la courbure de la membrane au niveau de la GUV était donc très faible comparée à la courbure de la membrane au niveau du tube.

A la suite de l'extraction du tube de membrane, nous attendions 10 min de façon à atteindre l'équilibre dans la répartition des protéines GL1. Puis, nous avons comparé l'intensité des signaux fluorescents de la protéine sur la membrane au niveau du tube et de la GUVs. Pour cela, l'intensité du signal fluorescent de GL1^{G116}-PE sur le tube (I_{GL1}^{tube}) et du lipide ATTO647 (I_{lip}^{tube}) était mesurée en plusieurs endroits du tube en relevant le pic d'intensité le long de droites coupant le tube (Fig. 7.5.A). Puis, les signaux fluorescents de la protéine (I_{GL1}^{GUV}) et du lipide (I_{lip}^{GUV}) étaient relevés sur la membrane de la GUV de la même façon (Fig. 7.5.A). Le signal fluorescent des lipides permettait de normaliser le signal fluorescent des protéines puisque la répartition des lipides sur la membrane n'était pas affectée par la courbure [92]. Les fonds fluorescents de la protéine (I_{GL1}^{fond}) et du lipide (I_{lip}^{fond}) étaient aussi mesurés au voisinage de la GUV et du tube en relevant l'intensité de fluorescence moyenne le long d'une droite tracée au voisinage de la membrane

mais ne la coupant pas (Fig. 7.5.A). Le fond fluorescent était ensuite retranché aux signaux fluorescents relevés sur les membranes. Un enrichissement potentiel de la protéine sur le tube ou la GUV a été quantifié en calculant le rapport suivant :

$$\frac{(I_{GL1}^{tube} - I_{GL1}^{fond})(I_{lip}^{GUV} - I_{lip}^{fond})}{(I_{lip}^{tube} - I_{lip}^{fond})(I_{GL1}^{GUV} - I_{GL1}^{fond})} \quad (7.4)$$

Les rapports obtenus sont systématiquement supérieurs à 1, il y a donc un recrutement de la protéine dans le tube (Fig. 7.5.B). Ces rapports calculés sur l'ensemble de nos données (11 tubes), ont été convertis en pourcentage puis nous avons pris en compte l'ancrage de la protéine sur les deux parois de la GUV en ajoutant un facteur deux au pourcentage de recrutement observé. Toutefois, nous ne savons pas si la protéine recrutée est ancrée sur la paroi interne ou externe de la GUV. Une étude menée sur Atg8 montre un enrichissement de la protéine sur des membranes de courbures positives élevées, cette protéine étant quasiment identique à GL1 nous pouvons présumer un comportement similaire [73]. En conclusion, les protéines recrutées dans le tube étaient très probablement celles ancrées sur la paroi externe de la GUV.

En observant la distribution du pourcentage de recrutement en fonction du rayon du tube, aucune tendance ne se dégage (Fig. 7.6). Cependant, nous supposons qu'il existe un rayon de tube au-delà duquel la protéine ne se ségrège pas car la courbure correspondante ne serait plus suffisamment élevée. Les rayons de tubes que nous avons explorés ne sont donc peut-être pas suffisamment larges pour observer une absence de recrutement. L'étude menée sur la protéine Atg8 montre un recrutement de la protéine dans un tube d'environ 50 % lorsque la tension de membrane est de 0,01 mN/m, puis si la tension est élevée à 0,2 mN/m l'enrichissement augmente à 200 % [73]. Nous avons calculé les rayons de tubes correspondant en utilisant la valeur du module de courbure mesurée précédemment. Dans le cas d'une tension de 0,01 mN/m, le rayon du tube formé est d'environ 90 nm, pour une tension de 0,2 mN/m, le rayon du tube est d'environ 20 nm. Le plus large tube que nous ayons obtenu mesure 37 nm de rayon, ce qui est largement inférieur à 90 nm. Nous avons donc réalisé une moyenne de nos pourcentages de recrutement sur l'ensemble de nos tubes et nous obtenons un recrutement moyen de 279 ± 42 % pour un rayon moyen de tube de 27 ± 3 nm. Nous trouvons donc un pourcentage de recrutement de GL1 similaire à celui d'Atg8 pour des rayons de courbure du même ordre de grandeur.

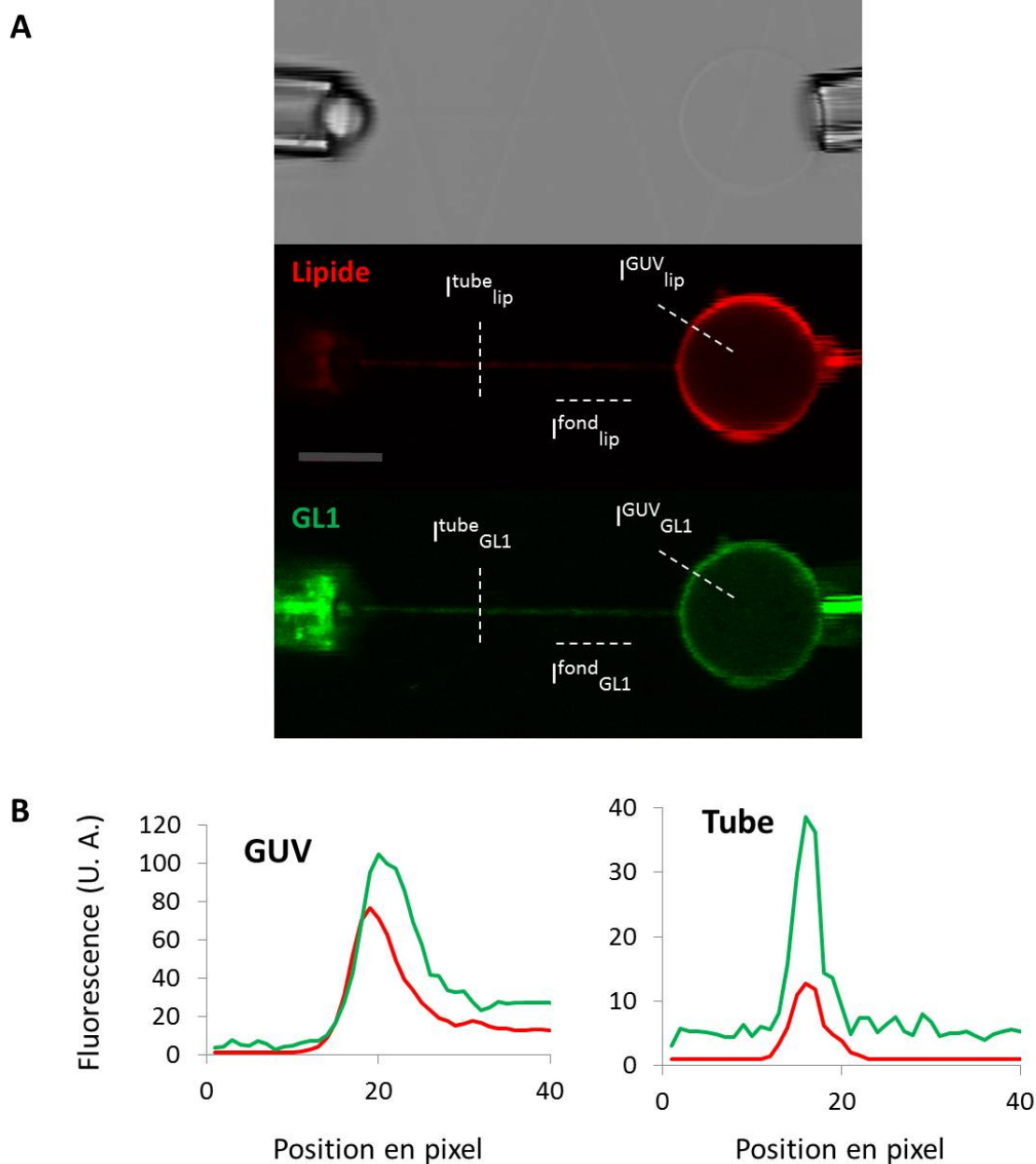


FIGURE 7.5: **Recrutement de la protéine GL1 sur les membranes de courbure élevée.** (A) Image d'un tube de membrane extrait d'une GUV prise au microscope confocal en transmission (haut) et en fluorescence, lipide (ATTO647, rouge) et protéine (Alexa488, vert). L'intensité de fluorescence est relevée le long des lignes pointillées blanches. Barre d'échelle : 10 μm . (B) Graphiques de l'intensité de fluorescence le long des lignes pointillées blanches tracées sur les images (A), au niveau de la membrane de la GUV (haut) et du tube (bas). Les courbes vertes correspondent au signal de la protéine et les courbes rouges au signal des lipides.

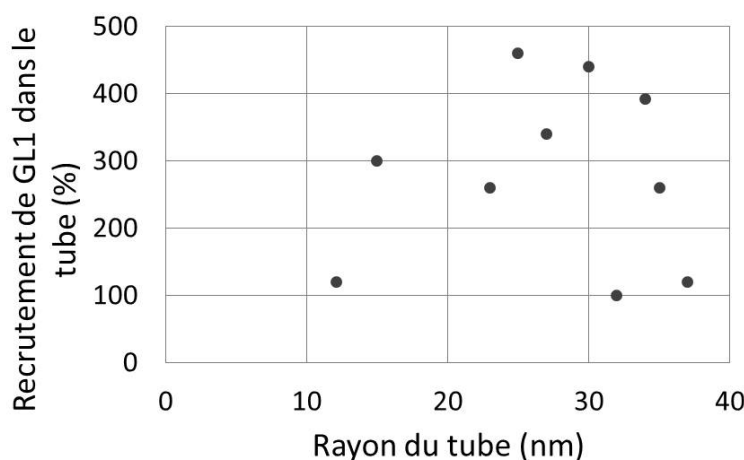


FIGURE 7.6: **Recrutement de la protéine GL1 dans le tube.** Graphique du recrutement en pourcentage de la protéine GL1 dans le tube en fonction du rayon du tube en nm.

La membrane du PA croît de façon anisotrope et adopte une forme de coupe à un stade intermédiaire. Les mécanismes permettant d'expliquer une telle morphologie sont encore peu connus. Nous avons émis l'hypothèse que la protéine GL1 dans ses interactions avec la membrane pouvait en partie expliquer cette croissance directionnelle. D'après nos résultats sur le recrutement de la protéine GL1 vers les membranes de fortes courbures positives et nos observations sur les interactions homotypiques de GL1 en trans, nous pouvons postuler le modèle suivant. A la surface de la membrane du PA, la protéine GL1 serait recrutée dans des zones de courbures élevées qui correspondraient très probablement aux bords ou aux extrémités du PA naissant. Une concentration plus élevée en protéine entraînerait une adhésion plus élevée de membranes portant elles-mêmes la protéine GL1 ce qui conduirait à une croissance dirigée de la membrane (Fig. 7.7).

7.5 Prédiction du recrutement de la protéine selon la différence de courbure entre deux régions de la membrane

Le recrutement de protéines dans des tubes de membranes extraits de vésicules a déjà été étudié pour d'autres protéines membranaires. Des modèles théoriques

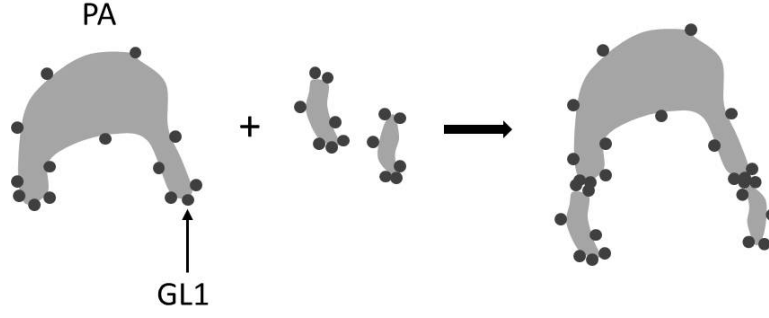


FIGURE 7.7: **Schéma d'une croissance possible du PA.** La protéine GL1 se distribue préférentiellement sur les membranes les plus courbées du PA ce qui favorise l'adhésion de bout de membrane lipidique à cet endroit.

ont été établis pour modéliser la répartition de la protéine en fonction des caractéristiques de la membrane [93]. En nous basant sur ces études précédentes, nous avons construit un modèle permettant de prévoir la distribution des protéines GL1 sur une membrane possédant deux régions de courbures différentes. La première région a une courbure C_1 et une surface S_1 , la seconde a une courbure C_2 et une surface S_2 . N protéines GL1 peuvent diffuser librement d'une région à l'autre, n_1 protéines sont dans la région 1 et $n_2 = N - n_1$ protéines sont dans la région 2. Nous pouvons alors définir une concentration en protéines sur l'ensemble de la surface $\rho_0 = N/(S_1 + S_2)$ et une concentration en protéine sur chaque région $\rho_1 = n_1/S_1$ et $\rho_2 = n_2/S_2$. D'après nos mesures effectuées dans la partie 7.3, le module de courbure K de la membrane varie avec la concentration en protéine à sa surface ρ . Toutefois, cette expérience ne nous permet pas de savoir si cette variation du module de courbure apparente est due à un changement du module de courbure lui-même ou bien à une variation de la courbure spontanée de la membrane. Nous exprimerons donc dorénavant le module de courbure K comme un K_{eff} dépendant du module de courbure K et de C_0 . En supposant une dépendance linéaire du module de courbure K_{eff} à ρ , nous pouvons l'écrire :

$$K_{eff}(\rho) = A + \rho K'_{eff}(\rho_0) \quad (7.5)$$

Où $K'_{eff}(\rho_0)$ est positif si la protéine est défavorable à la courbure et négatif si la protéine favorise la courbure, ce dernier cas étant celui de GL1. A présent calculons l'énergie de la membrane en fonction de n_1 :

$$E(n_1) = 2K_{eff}(\frac{n_1}{S_1})S_1C_1^2 + 2K_{eff}(\frac{n_2}{S_2})S_2C_2^2 = B + 2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)n_1 \quad (7.6)$$

B dépend de N, $K_{eff}(\rho_0)$ et $K'_{eff}(\rho_0)$.

La fonction de partition du système s'écrit :

$$Z = Z_0 \sum_{n_1=0}^N \binom{N}{n_1} S_1^{n_1} S_2^{n_2} \exp(-\frac{E(n_1)}{k_B T}) = Z_1 (S_1 \exp \frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{k_B T} + S_2)^N \quad (7.7)$$

Où :

$$Z_1 = Z_0 \exp(\frac{-B}{k_B T}) \quad (7.8)$$

Nous pouvons alors calculer le nombre moyen de protéines dans la région 1 :

$$\begin{aligned} \langle n_1 \rangle &= \frac{Z_0 \sum_{n_1=0}^N \binom{N}{n_1} n_1 S_1^{n_1} S_2^{n_2} \exp(-\frac{E(n_1)}{k_B T})}{Z} \\ \langle n_1 \rangle &= \frac{S_1}{Z} \frac{dZ}{dS_1} \\ \langle n_1 \rangle &= \frac{S_1 \exp \frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{k_B T}}{S_1 \exp \frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{k_B T} + S_2} \end{aligned} \quad (7.9)$$

La concentration de protéines dans la région 1 s'écrit donc :

$$\rho_1 = \frac{\exp \frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{k_B T}}{S_1 \exp \frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{k_B T} + S_2} \quad (7.10)$$

Et dans la région 2 :

$$\rho_2 = \frac{1}{\frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{S_1 \exp k_B T} + S_2} \quad (7.11)$$

Nous pouvons alors écrire le rapport entre les deux concentrations, que nous avons calculé expérimentalement dans la partie précédente 7.4 :

$$\frac{\rho_1}{\rho_2} = \exp \frac{-2(C_1^2 - C_2^2)K'_{eff}(\rho_0)}{k_B T} \quad (7.12)$$

Enfin, nous pouvons tracer ρ_1/ρ_2 en fonction de $C_1^2 - C_2^2$ pour différentes valeurs de $K'_{eff}(\rho_0)$ (Fig. 7.8).

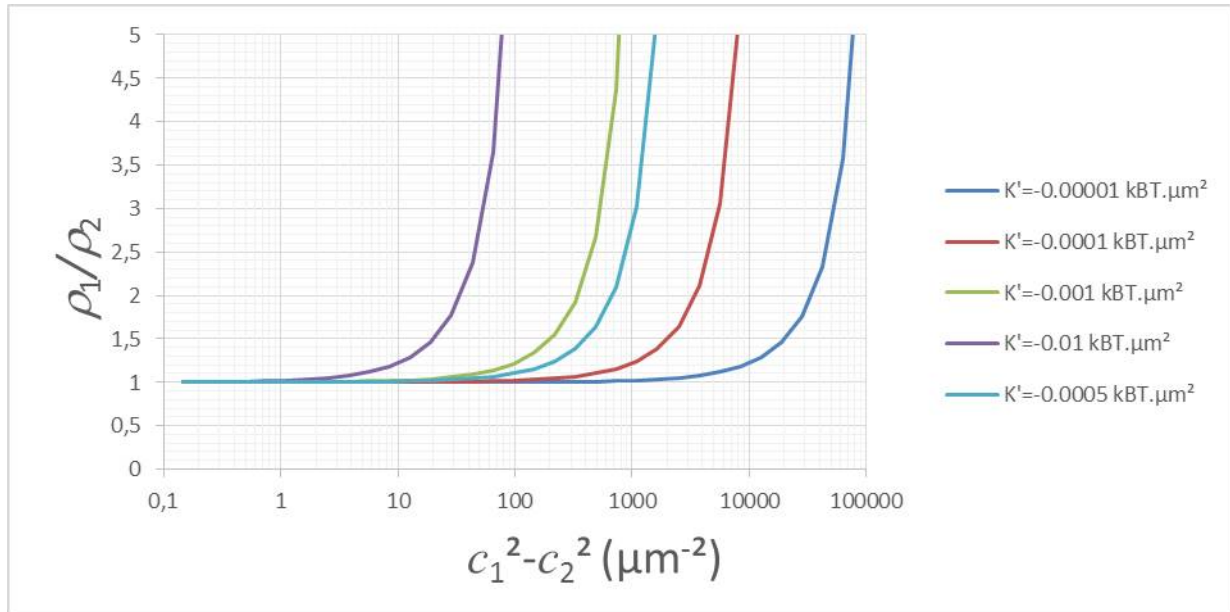


FIGURE 7.8: **Prévision du recrutement de GL1 dans le tube.** Graphique de ρ_1/ρ_2 en fonction de $C_1^2 - C_2^2$ pour différents K'_{eff} .

Lors de l'expérience sur le recrutement de GL1 dans le tube de membrane (voir 7.4), le rayon du tube (région 1) est environ 30 nm, la courbure correspondant est donc $C_1 \simeq 30 \mu\text{m}^{-1}$ et le rayon de la vésicule (région 2) est d'environ 10 μm , alors $C_2 \simeq 0.1 \mu\text{m}^{-1}$. Alors nous avons $C_1^2 - C_2^2 = 10^3 \mu\text{m}^{-2}$. Dans ces conditions, nous avons observé un recrutement $\rho_1/\rho_2 \simeq 3$, la valeur correspondante de $K'_{eff}(\rho_0)$ calculée avec la relation 7.12 est $-5.10^{-4} K_B T. \mu\text{m}^2$. Cette valeur est cohérente avec

celle que nous avons trouvé expérimentalement. Puisque, nous avons mesuré un K_{eff} de $2,7 \cdot 10^{-19}$ J en l'absence de protéines et un K_{eff} de $1,6 \cdot 10^{-19}$ J en présence de protéines sur la membrane ce qui correspond à une variation d'environ $28 K_B T$ pour une concentration en protéine variant de 0 à 1 protéine pour 650 nm^2 . Nous pouvons calculer la valeur de K'_{eff} suivante $K'_{eff}(\rho_0) = -20 \cdot 10^{-3} K_B T \cdot \mu\text{m}^2$. Il est normal que la valeur mesurée soit plus faible, car lorsque la protéine est ajoutée à la membrane le module de courbure décroît rapidement au début, mais il ne peut pas toujours décroître, le module de courbure ne pouvant être négatif.

A présent, vérifions que notre modèle fonctionne avec les données expérimentales obtenues sur la protéine Atg8 par Knorr et al. [73]. Leurs mesures de recrutement ont été réalisées sur deux tailles de tubes, environ 20 nm et 90 nm de rayon, ce qui correspond respectivement à une courbure de $50 \mu\text{m}^{-1}$ et $10 \mu\text{m}^{-1}$, le rayon de la GUV est similaire au notre donc $C_2 \simeq 0.1 \mu\text{m}^{-1}$. Pour $C_1 = 100 \mu\text{m}^{-1}$, ils trouvent aussi un rapport ρ_1/ρ_2 environ égal à 3, leur $K'_{eff}(\rho_0)$ est donc du même ordre de grandeur que le notre et calculé avec la relation 7.12 nous obtenons $K'_{eff}(\rho_0) = -2 \cdot 10^{-4} K_B T \cdot \mu\text{m}^2$. Dans le cas où $C_1 = 10 \mu\text{m}^{-1}$, l'équation prédit un rapport $\rho_1/\rho_2 \simeq 1$, ce qui signifie une absence de recrutement qui se vérifie par leurs observations expérimentales. En conclusion, notre modèle de prévision de distribution de la protéine GL1 fonctionne sur nos données et de données obtenues par une autre équipe.

En utilisant les données connues sur le PA, taille et concentration en protéines à sa surface, nous pouvons émettre une prédiction sur la répartition de la protéine sur sa membrane en nous basant sur le modèle développé. Le PA mesure entre 100 et 400 nm lors de sa croissance en forme de coupe, nous pouvons donc estimer son rayon de courbure principal à 100 nm, donc $C_2 = 10 \mu\text{m}^{-1}$, et le rayon de courbure de ses bords à environ 10 nm, $C_1 = 100 \mu\text{m}^{-1}$ (voir 2.2.3). Alors, dans le cas du PA, $C_1^2 - C_2^2 = 10^4 \mu\text{m}^{-2}$. La concentration en lipide sur la membrane de l'autophagosome a été évaluée à 1 sur 2000 nm^2 [85], nos concentrations sont du même ordre de grandeur, la valeur du $K'_{eff}(\rho_0)$ calculée dans nos expériences peut donc être réutilisée. En appliquant la formule 7.12, nous obtenons un rapport ρ_1/ρ_2 environ égal à 10^4 ce qui signifie que toute la protéine se concentre dans les zones de fortes courbures comme les bords du PA. Cependant, ces résultats sont à considérer avec précaution car une faible erreur sur le $K'_{eff}(\rho_0)$ entraîne de grandes variations de ρ_1/ρ_2 (Fig. 7.9).

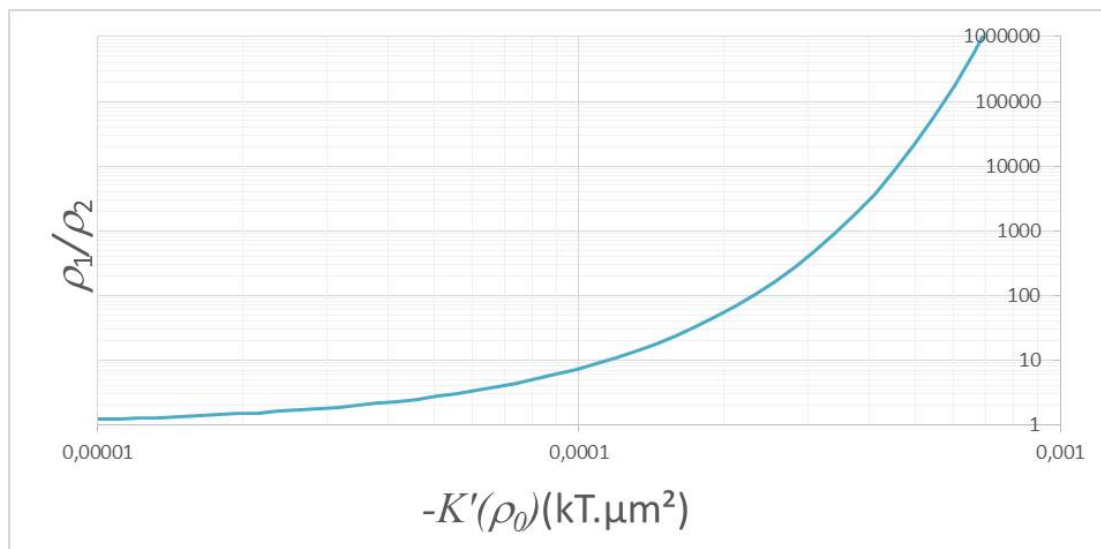


FIGURE 7.9: **Prévision du rapport ρ_1/ρ_2 en fonction de $K'_{eff}(\rho_0)$ pour $C_1^2 - C_2^2 = 10^4$.**

Ce modèle de répartition de la protéine GL1 est vérifié avec nos données et des données obtenues par une équipe indépendante. Toutefois, ce modèle comporte une limite, la protéine ne peut s'accumuler indéfiniment à cause de l'encombrement stérique des protéines, pour des concentrations ρ_0 trop élevé le modèle n'est donc plus valable. Nos collaborateurs ont réussi à lipider jusqu'à 1 protéine pour 20 lipides sur des petits liposomes. Nos concentrations étant largement plus faibles, notre modèle peut donc s'appliquer.

Dans ce modèle nous avons supposé que la répartition de GL1 sur une membrane présentant deux zones de courbures différentes était due à une optimisation de l'énergie de la membrane via son module de courbure K_{eff} qui varie avec la concentration en protéines. K_{eff} est lui même dépendant du module de courbure K et de la courbure spontanée de la membrane C_0 . D'après nos expériences nous ne pouvons pas conclure sur les origines de la variation du module de courbure K_{eff} . Néanmoins nous pouvons supposer que GL1 change le module de courbure K de la membrane car lors de l'extraction du tube pour la mesure du module de courbure, GL1 est présente sur les deux côtés de la bicouche, la courbure spontanée C_0 n'intervient donc à priori pas. Toutefois il est possible que les protéines GL1 modifient le C_0 lorsque la répartition des protéines est asymétrique sur les deux feuillettes de la bicouche comme sur le tube de membrane.

Conclusion

La morphologie de l'autophagosome évolue lors de sa formation ; d'un agrégat de membranes isolées à une vésicule à double membrane. L'étude de ces changements de structure doit prendre en compte les propriétés mécaniques de la membrane et les protéines qui agissent sur la membrane. Ces deux paramètres sont en général couplés et s'autorégulent. La protéine GABARAP, étant donné son ancrage permanent sur la membrane de l'autophagosome, joue certainement un rôle majeur lors de la croissance de l'organelle. Cette protéine a déjà fait l'objet d'études qui ont notamment prouvé sa capacité à faire adhérer les membranes. Néanmoins, à ce jour, peu de choses sont connues sur les interactions entre GABARAP et la membrane. Comment la membrane selon ses caractéristiques régule l'activité de la protéine GABARAP ou bien comment la protéine GABARAP modifie les propriétés mécaniques de la membrane, demeurent des questions largement ouvertes. En utilisant des membranes modèles et plus spécifiquement des GUVs, j'ai cherché à caractériser précisément différentes interactions de la protéine GABARAP avec la membrane.

Une première étape de mon travail de recherche fut de reconstituer la protéine dans la membrane de GUVs. L'utilisation de protocoles traditionnels ne m'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants ce qui m'a conduit à élaborer une nouvelle méthode pour la formation de GUVs et de protéo-GUVs. Ce protocole, basé sur un choc osmotique, a permis d'insérer trois protéines dont GABARAP dans la membrane des GUVs, il n'est donc pas spécifique à ma protéine d'intérêt. Lors de la mise en place de ce protocole, j'ai été amenée à contrôler l'unilamellarité des GUVs formées ainsi que la fonctionnalité et le taux d'incorporation de la protéine GABARAP. A la suite de la méthode du choc osmotique, j'ai obtenu une concentration de la protéine sur la membrane des GUVs du même ordre de grandeur que celle sur l'autophagosome en formation.

Grâce aux GUVs, j'ai étudié la distribution de la protéine à la surface d'une membrane avec des microdomaines, la phase liquide ordonnée mimant les rafts présents sur les membranes biologiques. Mes observations montrent que la répartition de la protéine est conditionnée par la chaîne hydrophobe du lipide d'ancrage. Accrochée à un lipide insaturé la protéine GABARAP est ségrégée dans la phase liquide désordonnée et liée à un lipide saturé elle se ségrège dans la phase liquide ordonnée et plus spécifiquement à la limite des deux phases en formant un agrégat. La composition lipidique de l'autophagosome est inconnue et donc la présence de rafts incertaine. En conséquence, je ne sais pas si ces résultats ont une signification biologique. Toutefois ils permettent de montrer l'importance de la chaîne lipidique d'ancrage dans le comportement de la protéine, surtout dans le cas des lipides saturés où une très faible concentration suffirait à entraîner une forte agrégation de la protéine au niveau des rafts.

Ensuite, je me suis intéressée aux interactions en cis de la protéine dans la phase liquide désordonnée. J'ai cherché à déterminer une éventuelle oligomérisation de GABARAP sur des membranes avec deux phases liquides ou une phase liquide. Deux stratégies ont été explorées pour cette étude ; l'observation de la dynamique de la protéine via des mesures de FRAP et des mesures de photoblanchiment par palier. L'étude de la dynamique de la protéine a révélé un comportement diffusif similaire de GABARAP et des lipides et cela pour les deux compositions membranaires. La protéine est donc monomérique ou faiblement oligomérisée sur la membrane des GUVs. Une expérience de photoblanchiment par paliers m'a permis de confirmer ce résultat bien que les données aient été difficilement analysables à cause du faible taux de marquage de la protéine. Je peux donc présumer de cette expérience que la protéine GABARAP ancrée sur l'autophagosome est monomérique ou forme des petits oligomères dans les zones où la membrane est faiblement courbée.

Après avoir étudié l'interaction en cis de la protéine, j'ai cherché à déterminer la nature de l'interaction en trans de GABARAP. La micromanipulation de deux GUVs de composition contrôlée en protéines a montré une interaction homotypique de GABARAP en trans. Ces associations de protéines étaient suffisamment stables pour résister à la séparation des GUVs et former un patch. Je peux donc présumer que lors de l'élongation de l'autophagosome si l'adhésion des membranes isolées se fait via la protéine GABARAP alors celle-ci doit être présente sur les deux membranes.

Au travers de la même expérience j'ai cherché à déterminer une éventuelle fusion des membranes due à la protéine GABARAP. Lors de la mise en contact de deux GUVs avec la protéine, aucun échange de lipides fluorescents n'a pu être observé. En m'appuyant sur un modèle de diffusion, j'ai pu estimer que même l'ouverture d'un pore de faible diamètre aurait dû être visible dans mes conditions d'observation. En conclusion, la protéine GABARAP ne permet pas la fusion des membranes dans mes conditions expérimentales. Cette fonction de la protéine fait toujours débat au sein de la communauté scientifique, la fusion des membranes semble dépendre fortement de la composition en lipides de la bicouche et de l'homologue de la protéine GABARAP mis en jeu. Mes observations confirment les expériences menées par d'autres équipes dans des conditions similaires aux nôtres.

L'étude de l'interaction en trans de GABARAP, m'a amené à réaliser deux expériences portant sur la courbure de la membrane car, lors de la séparation de deux GUVs dont une seule portait la protéine, un tube se formait le plus souvent du côté de la GUV avec la protéine. J'ai commencé par mesurer les modules de courbure de la membrane d'une GUV avec et sans protéine ancrée. Cette expérience a montré une diminution du module de courbure de la membrane lorsque celle-ci portait la protéine. GABARAP facilite donc la déformation de la membrane. Ensuite, j'ai analysé la distribution de la protéine sur une membrane présentant deux courbures une faible et une élevée, en tirant un tube d'une GUV. Un recrutement de la protéine dans le tube d'environ 300 % a pu être mesuré. Ces résultats laissent supposer une répartition inégale de GABARAP à la surface de l'autophagosome puisque sa membrane présente des régions de courbures différentes. En effet, lors de sa formation l'autophagosome adopte une forme de coupe, les bords sont donc plus courbés que le reste de sa surface. GABARAP y serait donc recruté et y favoriserait l'adhésion de membranes isolées ce qui entraînerait une croissance asymétrique de l'autophagosome. Ces études sur la courbure de la membrane ont été achevées par la proposition d'un modèle permettant de prédire la distribution de la protéine sur une membrane possédant deux régions de courbures différentes. Ce modèle a pu être vérifié sur des données expérimentales obtenues par groupe de recherche indépendant travaillant sur la protéine Atg8.

Mon travail de recherche a permis de caractériser des interactions entre les membranes et la protéine GABARAP. J'ai pu montrer que la membrane au travers de sa composition et de sa courbure régule l'activité de la protéine et que la protéine ancrée modifie une propriété mécanique de la membrane, son module de courbure.

D'un point de vue biologique, ces résultats permettent d'appréhender avec plus d'exactitude l'activité de GABARAP sur la membrane de l'autophagosome.

Annexe A

Small liposomes preparation

Protocols will be described in English, thus they could be accessible to non French people.

During my PhD, I used the lipids listed in the figure [A.1](#). They were all purchased from Avanti Polar Lipids except the ATTO lipid purchased from ATTO-TEC and the DHPE-Oregon Green and the DHPE-Texas Red purchased from Life Technologies. Lipids were prepared and stocked in chloroform.

Avanti Polar Lipids	ATTO-TEC
DOPC	DOPE-ATTO647
POPC	DOPE-ATTO488
DPPC	
DOPS	Life Technologies
POPS	DHPE-TexasRed
DOPE	DHPE-OregonGreen
DPPE	
DMPE	
DOPE-maleimide	
DSPE-biotin	
Cholesterol	
DOPE-NBD	
DOPE-Rhodamine	

FIGURE A.1: Lipids used during this project and suppliers.

The final lipid concentration in the liposome solution was usually set at 10 mM. If a lower lipid concentration was needed, the liposome solution was diluted after preparation. The volume of the final liposome solution was usually between 300 μ l and 500 μ l.

The lipid compositions were various, we won't detail it here since they were given in the main text. We chose one composition as an example, the one used in part 4.5.1 (Fig. A.2).

Lipids	MW	Initial [mg/ml]	Final %	V (μ l)	Final V (μ l)	Final [mM]
DOPE	744	25	30	26,8	300	10
DOPC	786	25	69	65,1		
DOPE-ATTO647	1319	1	1	39,6		

FIGURE A.2: **Lipid mixture.** The molecular weight (MW) and the initial concentration of each lipid (Initial [mg/ml]) is indicated. The final volume of the liposome solution (Final V (μ l)) was 300 μ l and the final concentration in lipids (Final [mM]) 10 mM. The percentage of each lipid in the lipid mixture is indicated as Final %. The volume of each lipid to mix is noted V (μ l).

The lipid mixture was prepared in a glass tube (26.8 μ l DOPE + 65.1 μ l DOPC + 39.6 μ l DOPE-ATTO647) (Fig. A.2) and dried with nitrogen gas for a few minutes in order to evaporate the chloroform. Subsequently, lipids were dried under vacuum with a dessicator for 1 hour to remove the remaining chloroform.

The dried lipid film was resuspended in buffer, to get a 10 mM lipid concentration (300 μ l in this case), by vortexing for 15 minutes. The buffer composition was always 100 mM NaCl and 50 mM Trizma hydrochloride (pH 7.6), except when the buffer composition was tested (4.4.1 and 4.4.2). The temperature during this step was maintained above the highest transition temperature of the present lipids. For unsaturated lipids, room temperature was enough. There is no control of the lamellarity and size of the liposomes at this stage.

The liposome solution was subjected to five cycles of freezing and thawing using alternatively liquid nitrogen and warm bath (~ 25 $^{\circ}$ C).

Two methods were used to control the size of liposomes : extrusion to get liposomes from 100 nm to 400 nm diameter and tip sonication to get liposomes of 50 nm diameter.

The extrusion was performed with an extruder, from Avanti Polar Lipids, with 100, 200 or 400 nm pore membranes. The liposomes go through the membranes 21 times.

The tip sonication was done on liposome solutions through 5 cycles of 1 minute each. In each cycle liposomes were sonicated for 30 seconds and then not sonicated for the next 30 seconds.

Annexe B

Dye preparation and protein GL1^{G116} labelling

The Alexa Fluor488 C5-maleimide dye was purchased from Life Technologies in powder. During all the preparation the dye should be protected from light by wrapping tubes and aliquots in aluminium foils.

First, it was dissolved in methanol to reach a 800 μM concentration. Then the solution was split in 100 μl aliquots and dried with a speed vacuum.

The aliquots were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The GL1^{G116} protein was labelled with the Alexa Fluor488 C5-maleimide dye through the amino terminal cysteine.

100 μl of GL1^{G116} ($\sim 100\text{ }\mu\text{M}$ stock concentration) was mixed with 10 μl TCEP (6 mM stock concentration). The mixture was incubated for 5 minutes at room temperature.

One aliquot of dye was resuspended in 10 μl DMSO so the final dye concentration was 8 mM. The whole volume of dissolved dye was added to the protein mixture.

The final mixture was protected from the light and slowly shaken at room temperature for 2 hours or overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Labelled GL1^{G116} was then dialyzed with cassettes (molecular weight cut off at 7 KDa), from Life Technologies, in 4 L buffer (100 mM NaCl, 50 mM Trizma

hydrochloride, 1 mM DTT, pH 7.6) overnight at 4°C to remove the excess of free dye.

Annexe C

Lipidation reaction of GL1^{G116}

The final volume of the lipidation reaction was at least 100 μ l, because the smallest volume of the dialysis cassettes used at the end was 100 μ l.

The liposomes used for the lipidation reaction should contain PE lipids, the different compositions were detailed in the main text. The size of the liposomes was also given in the main text, when a special size was needed. When nothing was indicated it means that no specific size was required and the liposomes preparation stopped after the freeze fracture cycles, it was the case for liposomes used for the osmotic shock method.

Mix GL1^{G116} (5 - 15 μ M, final concentration) + DTT (1 mM, final concentration) + liposomes with PE lipids (3 mM, final concentration) + Atg3 or Atg3^{K11W} (1-5 μ M, final concentration) + Atg7 (1-2 μ M, final concentration) + ATP (1 mM, final concentration) + buffer if needed to complete the reaction (100 mM NaCl, 50 mM Trizma hydrochloride, 1 mM DTT, pH 7.6).

The use of Atg3 or Atg3^{K11W} was specified in the main text.

The mixture was incubated for 90 min at 37 °C. If liposomes were not extruded or sonicated, they tended to aggregate so the reaction solution was shaken during the incubation time.

Residual glycerol was removed from the GL1^{G116}-PE liposome mixture by dialysis with cassettes (molecular weight cut off at 7 KDa, from Life Technologies) in 4 L buffer (100 mM NaCl, 50 mM Trizma hydrochloride, 1 mM DTT, pH 7.6) overnight at 4°C.

Annexe D

Lipidation reaction of GL1^{G116C}

The lipidation reaction volume was at least 100 μ l, because the smallest volume of the dialysis cassettes at the end was 100 μ l.

The liposomes were neither sonicated nor extruded.

Mix GL1^{G116C} (5 - 15 μ M, final concentration) + TCEP (0.2 mM, final concentration) + liposomes (2 - 5 mol% maleimide lipid and 3 mM total lipid final concentration) + buffer if needed to complete the reaction (100 mM NaCl, 50 mM Trizma hydrochloride, 1 mM DTT, pH 7.6).

The mixture was shaken for 60 min at 37 °C.

Residual glycerol was removed from the GL1^{G116C}-PE liposome mixture by dialysis with cassettes (molecular weight cut off at 7 KDa, from Life Technologies) in 4 L buffer (100 mM NaCl, 50 mM Trizma hydrochloride, 1 mM DTT, pH 7.6) overnight at 4°C.

Annexe E

Osmotic shock method

Small liposomes, GL1^{G116}-PE liposomes or GL1^{G116C}-PE liposomes were prepared following the protocols in appendices [C](#) and [D](#). No specific size of liposomes was required so their preparations stopped after the freeze fracture cycles.

A glass coverslip was cleaned with isopropanol and a dust free tissue and then dried with pressurized nitrogen for few seconds.

A 2 μ l drop of small liposome or proteo-liposome (~ 3 mM lipids concentration) solution was placed on the coverslip and dried at room temperature under atmospheric pressure. The volume of the drop could be larger, the method would work as well, but the time of drying would be longer.

The dried drop was rehydrated with 6 μ l deionized water, and then dried again under the same conditions. The rehydration volume does not need to be 6 μ l exactly, it should be large enough to cover the previous dried drop.

The lipid film is rehydrated once more with a larger deionized water volume of 10-20 μ l and observed under the microscope.

GUVs or proteo-GUVs grew instantly from the rehydrated lipid films mainly in the areas with high concentration of lipids. The two sequential drying-rehydration cycles favor the formation of larger and more uniform GUVs.

During the hydration step the temperature should be above the highest transition temperature of the present lipid. If needed, we used an incubator or a heated plate.

Annexe F

Fluorescent signal measurement

The following protocol was applied to measure fluorescent signals on membranes in the experiments [4.5.2](#), [4.5.3](#), [4.6](#) and [7.4](#).

Using the Las Af software or Image J, the fluorescent signal on the membrane was measured drawing a line across the membrane and measuring the maximum fluorescent intensity along this line. To take in account the polarization of the laser that creates variation in the fluorescent signal (Fig. [F.1.A](#)), it was measured in four different areas of the GUV (Fig. [F.1.B](#)). In the case of the tube the fluorescent signal was measured in ten different positions along the tube.

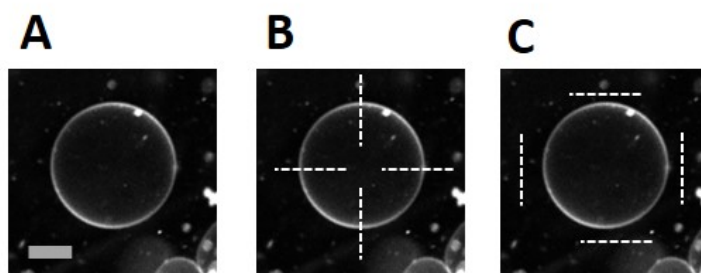


FIGURE F.1: **Polarization of the fluorescent signal.**(A) GUV composed of 99 mol% DOPC and 1 mol% DOPE-ATTO647. (B) The fluorescent signal on the membrane was measured along the white dashed line. (C) The fluorescent signal of the background was measured along the white dashed line. Confocal image in fluorescence (lipids), scale bar : 10 μm .

The background should be withdrawn from the membrane signal. So it was measured calculating the mean value intensity along a line drawn in areas close to the

membrane (Fig. [F.1.C](#)). A background average was done over four different lines and then subtracted to the membrane intensity average.

In order to have an accurate value of the fluorescent signal on the GUV membrane in one experiment, the measurement was repeated on several GUVs.

Annexe G

RavZ cleavage

Lipidated GL1^{G116} is a substrate for the protease RavZ and is cleaved.

GL1^{G116}–PE liposomes or GL1^{G116}–PE GUVs, produced as described in appendices [C](#) and [D](#), were incubated with RavZ (10 nM final concentration) at 37 °C for 10 min (small GL1^{G116}–PE liposomes) or at room temperature for 40 min (GL1^{G116}–PE GUVs).

The cleavage on the small GL1^{G116}–PE liposomes was checked on SDS-PAGE gels, 15 µl mixture was loaded into the gel. The band of the cleaved GL1^{G116} is shifted back to the position of GL1^{G116} before lipidation. The cleavage on GL1^{G116}–PE GUVs was verified by measuring the fluorescent signal of the protein on the membrane, as described in appendix [F](#), before and after the addition of RavZ. The signal should decrease by half after RavZ addition because only the protein anchored in the outer membrane could be cleaved.

Annexe H

Micropipette preparation

Micromanipulation was used to maneuver independent GUVs and keep them static in solution.

The micropipettes were made from thin glass tubes. First, a tube was pulled out with a pipette puller to get a tip at one extremity (Fig. H.1). Then, the tip was opened using a microforge (Fig. H.1). The internal diameter of the micropipettes was about 5 μm .

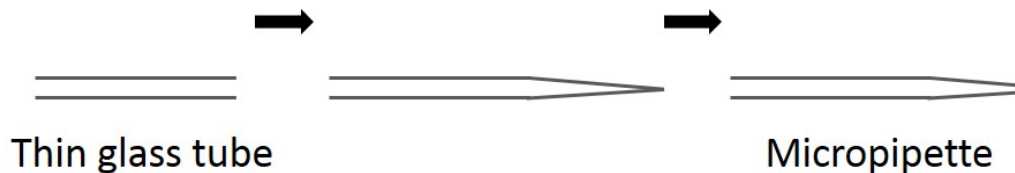


FIGURE H.1: **Micropipette preparation.**

Micropipettes were filled with the solution as the one inside the GUVs.

To prevent adhesion of GUVs on the glass, the pipette was incubated in a solution of 10 % BSA in pure water prior to use for 15 min.

Micropipettes were then fixed into a micromanipulator in order to control their positions.

The aspiration to maintain the GUVs was controlled by hydrostatic pressure and kept around 20 Pa.

Annexe I

Fluorescence recovering after photobleaching (FRAP)

Fluorescent recovering after photobleaching (FRAP) was performed on GUVs to monitor the diffusion coefficient of fluorescent lipid and fluorescent protein on the membrane.

GUVs were aspirated with a micropipette and maintained in a static position.

The focus was done on one pole of the GUV in order to observe an horizontal membrane surface.

Fluorescent proteins or lipids were bleached on a disc (7 - 15 μm diameter).

The fluorescent signal over the same area was measured for few minutes after the bleaching until it remained constant.

The fluorescence recovery curves were then analyzed with Mathematica 10 or Scilab 5.4 to determine the recovery time (τ), the plateau intensity and the slope at the origin.

Knowing τ and the diameter of the bleached area (d), we were able to calculate the diffusion coefficient (D).

$$D = \frac{d^2}{16\tau} \quad (\text{I.1})$$

Annexe J

Step bleaching experiment

Step bleaching experiments were used to determine the number of fluorophores per liposomes.

Small GL1^{G116}-PE liposomes were prepared as explained in appendix C. So the concentration of lipid was ~ 3 mM and the concentration of GL1^{G116} was between 5-15 μ M. Most of the protein should be lipidated or the measurement would be inaccurate. The lipidation efficiency was checked on a gel.

A phospholipid mixture (DOPC, 3 mM final concentration) was prepared in a glass tube and dried with nitrogen gas for few minutes to remove the chloroform. Subsequently, lipids were dried for 1 hour under vacuum in a dessicator to remove all the chloroform.

The GL1^{G116}-PE liposome solution was diluted by 10 000 in the buffer 100 mM NaCl + 50 mM TrisHCl, pH 7.6.

Then the solution of diluted GL1^{G116}-PE liposomes was used to resuspend the dried lipid film to 3 mM final concentration.

The mixture was shaken for 15 minutes at room temperature. During the mixing the small GL1^{G116}-PE liposomes fused with the small liposomes without proteins and no more than one oligomer of GL1^{G116} is supposed to be present on each liposome.

The new mixture of GL1^{G116}-PE liposome solution was spread on a glass (50 μ l). So the liposomes spread on the glass and formed a bilayer where the oligomers are anchored. Each oligomer could be observed as single fluorescent dot under TIRF

microscope. The solution of GL1^{G116}–PE liposomes could be diluted once more in the buffer (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 7.6) if the oligomers are not well separated.

The fluorescent dots were observed for 90 seconds under the TIRF microscope and a film was captured. Then their bleaching were analyzed using a macro on image J. It was designed to select the fluorescent dots above a certain intensity limit, then a square was delimited around it and the fluorescent intensity over time was plotted in this area. Manually, we looked at the graph to count the number of steps during the bleaching.

Annexe K

Tube extraction

Tubes were pulled from GUVs containing 0.5 mol% DSPE-biotine and using streptavidine coated beads measuring 5 μm diameter from Bangs Labs.

GUVs were grown with the osmotic shock method. The small liposomes were originally in a buffer containing 100 mM NaCl + 50 mM TrisHCl pH 7.6. A 4 μl drop of the small liposome solution was dried and rehydrated in the last step with 20 μl of water, so the final buffer concentration was 20 mM NaCl + 10 mM TrisHCl pH 7.6. The osmolarity of the medium was around 80 mosm.

In order to micromanipulate in a large volume and to get a part of the GUVs membrane projected inside the micropipette during the suction, 400 μl of buffer 25 mM NaCl + 12.5 mM TrisHCl pH 7.6 was added. The osmolarity of this solution was 100 mosm which is slightly higher than the osmolarity of the buffer inside the GUVs to deflate them.

The beads are initially highly concentrated 1 % in the stock solution so a fraction of the beads solution was diluted by 100. Subsequently, 10 μl of the diluted bead solution was added to the GUV solution.

Two micropipettes were needed, one to catch a GUV another one to catch a bead. The aspiration pressure on the GUV was around 20 Pa. The aspiration pressure should not be too high or the surface tension of the GUV would be too high and no tube could be pulled. The aspiration pressure on the bead did not need to be in a specific range, it only needed to be high enough to catch the bead, so around 20 Pa.

A contact was made between the GUV and the bead a few seconds. It was enough for streptavidins and biotins to bind. Then there were moved apart and a tube of membrane was pulled out from the GUV.

The measurement of the tube radius (R_t) was done by comparing the simultaneous variation of the length of the GUV projected inside the pipette (L_p) and the tube length (L_t) (Fig. K.1). Since the area and the volume of the GUVs is conserved during this process, we have the relationship [21] :

$$R_t = \frac{\Delta L_p}{\Delta L_t} \left(1 - \frac{R_p}{R_v}\right) R_p \quad (\text{K.1})$$

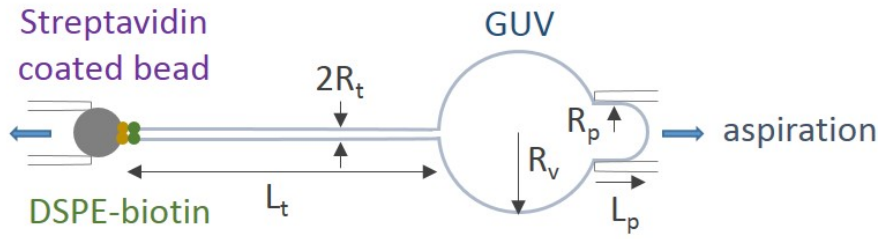


FIGURE K.1: **Schematics of a membrane tube pulled from a GUV.**

The GUV radius is noted (R_v) and the radius of the vesicle inside the pipette corresponds to the inner pipette radius and is noted (R_p). The bead was moved away from the GUV, so the tube get longer and in the meantime the membrane inside the pipette smaller (Fig. K.2). Usually, we varied the tube length from 10 μm to 150 μm .

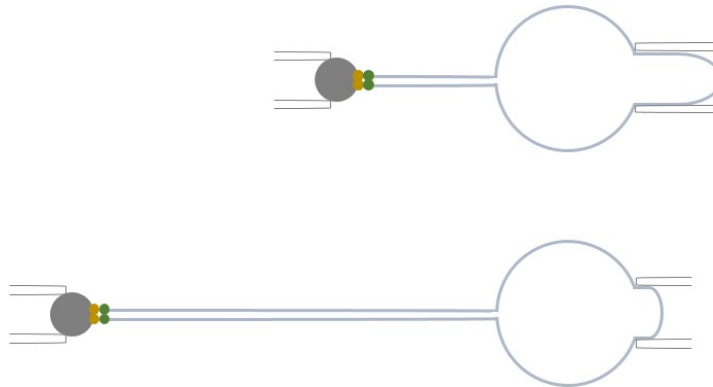


FIGURE K.2: **Simultaneous variation of the length of the GUV projected inside the pipette and the tube length.**

The tube radius could be controlled by changing the aspiration pressure, the higher the aspiration pressure was, the higher the surface tension was and the smaller the tube diameter was.

Annexe L

Electroformation

The electroformation protocol was inspired from Angelova et al.[82].

First, a lipid mixture was prepared in a glass tube. The final lipid concentration (Final [mM]) was 1 mM and the final volume of the lipid mixture in chloroform (Final V(μ l)) was 500 μ l. We choose as an exemple the lipid composition used in part 4.1.1 : 40 mol% DOPE, 49 mol% POPC, 10 mol% POPS and 1 mol% DOPE-Rhodamine.

Lipids	MW	Initial [mg/ml]	Final %	V (μ l)	Final V (μ l)	Final [mM]
DOPE	744	25	40	6,0	500	1
POPC	760	25	49	7,4		
POPS	784	10	10	3,9		
DOPE-Rhodamine	1275	1	1	6,4		
chloroform				473,3		

FIGURE L.1: **Lipid composition for the electroformation.** The molecular weight (MW) and the initial concentration of each lipid (Initial [mg/ml]) is indicated. The final volume of the lipid mixture (Final V (μ l)) was 500 μ l and the final concentration in lipids (Final [mM]) 1 mM. The percentage of each lipid in the lipid mixture is indicated as Final %. The volume of each lipid to mix is noted V (μ l).

So the lipid mixture was composed of 6 μ l DOPE + 7,4 μ l POPC + 3,9 μ l POPS + 6,4 μ l DOPE-Rhodamine + 473,3 μ l chloroform (Fig. L.1).

ITO plates were washed with water, ethanol and chloroform. Subsequently they were dried with pressurized nitrogen for few seconds.

A PDMS chamber, used to separate the ITO plates, was washed with water and ethanol. The size of the chamber was ~ 3 cm by 3 cm and the thickness ~ 2 mm. Two bands of aluminium were stuck to the PDMS, each one on a different side (Fig. L.2). Then, the PDMS chamber was placed on one ITO plate on the conductive side (Fig. L.2).

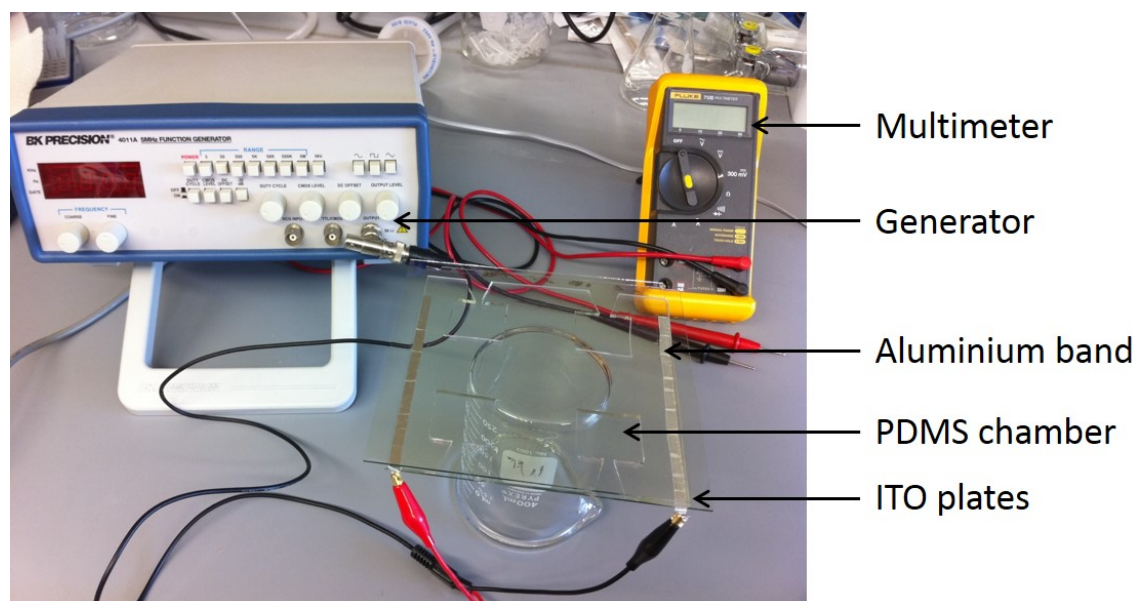


FIGURE L.2: **Electroformation set up.**

Then ~ 2 μ l drops of lipid mixture were placed on the ITO plate in the PDMS chamber, around 16 drops. The ITO plate was put under vacuum in a dessicator for 1 hour to remove the chloroform from the dried lipids.

The second ITO plate was placed on the PDMS chamber in order to seal the chamber. The conductive side of the ITO plate should be facing the chamber.

The chamber was filled with a solution of succrose (200 mosm). Then each aluminium band was connected to a generator and an alternative current was applied (8 Hz)(Fig. L.2). The tension was increased by step, each step lasted for 6 minutes, it started at 100 mV then 200 mV, 300 mV, 500 mV, 700 mM, 900 mM and 1.1 V. The last tension was applied for 1 hour.

GUVs grew from the lipid film attached to the ITO plate. In order to detach them we tapped on the glass. Then the GUV solution was transfered to a plastic tube and stored at 4 °C.

Annexe M

Supported bilayers fabrication

A lipid mixture was prepared in a glass tube. As an exemple, we choose one composition from part 4.1.1 : 1.3 μl DOPE-maleimide + 6.5 μl POPC + 2.0 μl POPS + 240.2 μl chloroform (Fig. M.1).

Lipids	MW	Initial [mg/ml]	Final %	V (μl)	Final V (μl)	Final [mM]
DOPE-maleimide	1007	10	5	1,3	250	1
POPC	760	25	85	6,5		
POPS	784	10	10	2,0		
chloroform				240,2		

FIGURE M.1: **Lipid composition of the supported bilayer.** The molecular weight (MW) and the initial concentration of each lipid (Initial [mg/ml]) is indicated. The final volume of the lipid mixture (Final V (μl)) was 250 μl and the final concentration in lipids (Final [mM]) 1 mM. The percentage of each lipid in the lipid mixture is indicated as Final %. The volume of each lipid to mix is noted V (μl).

The supported bilayers were prepared with the Langmuir-Blodgett technique in a petri dish. The medium of the supported bilayer after its fabrication is water. We wanted to change it to a physiological buffer (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 7.6), so we partially removed the water and replaced it by buffer. We repeated this exchange of solution three times.

The supported bilayer was observed under the confocal microscope in fluorescence and a z stack was done accross the bilayer.

TCEP was added to reach a concentration of 1 mM in the supported bilayer medium then the protein GL1^{G116C} was added (final concentration 100 nM). The supported bilayer was incubated with the protein for 30 minutes at room temperature. Then another exchange of medium was done to remove the unbound protein and as before we did it three times. Subsequently, a second observation under the confocal microscope was realized with the same settings as before. A z stack was done across the bilayer and the fluorescent signal of the protein GL1^{G116C} on the membrane was compared with the fluorescent signal on the membrane before protein addition.

Annexe N

Quantification of the protein GL1^{G116} on GUVs membranes

Two dyes, ATTO 488 maleimide (from ATTO-TEC) and Alexa Fluor 488 C5 maleimide (Life Technologies), were required to quantify the protein GL1^{G116} anchored to GUVs membrane.

All observations in fluorescence under the confocal microscope were done with the same settings.

The dyes were dissolved in buffer (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 7.6) at four different concentrations : $16 \cdot 10^{-4}$ mM, $8 \cdot 10^{-4}$ mM, $4 \cdot 10^{-4}$ mM and $1.6 \cdot 10^{-4}$ mM. A drop of 5 μ l of each dye for each concentration was placed on a glass slide and observed under the confocal microscope in fluorescence. A z stack was done across the drop and the glass slide to measure the maximum intensity of the dye fluorescent signal. As shown in the figure 4.9, the fluorescent signal of each dye is linear with the dye concentration and there is a ratio of 2 between the fluorescence of ATTO488 and Alexa488.

GUVs were prepared with different concentrations of DOPE-ATTO488 lipids : 0.2 mol%, 0.1 mol%, 0.05 mol%, the lipid compositions were complete with DOPC. Subsequently, the fluorescent signal on the membrane was measured as described in the appendix F to get a scale of fluorescence in function of the fluorescent lipids concentration.

Knowing the ratio of fluorescence between the two dyes, a scale of Alexa488 concentration on the membrane in function of the fluorescent signal could be done.

Bibliographie

- [1] Ranjit Sahu, Susmita Kaushik, Cristina C. Clement, Elvira S. Cannizzo, Brian Scharf, Antonia Follenzi, Ilaria Potolicchio, Edward Nieves, Ana Maria Cuervo, and Laura Santambrogio. **Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes.** *Developmental Cell*, 20(1) :131–139, 2011.
- [2] Christer S. Ejsing, Julio L. Sampaioa, Vineeth Surendranatha, Eva Duchoslavb, Kim Ekroosc, Robin W. Klemm, Kai Simonsa, and Andrej Shevchenko. **Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7) : 2136–2141, 2009.
- [3] Ruthven N. A. H. Lewis, Nanette Mak, and Ronald N. McElhaney. **A differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains.** *Biochemistry*, 26(19) :6118–6126, 1987.
- [4] Charles D. Niebylski and Jr. Norman Salem. **A Calorimetric Investigation of a Series of Mixed-Chain Polyunsaturated Phosphatidylcholines : Effect of sn-2 Chain Length and Degree of Unsaturation.** *Biophysical Journal*, 67(6) :2387–2393, 1994.
- [5] Marie-Cecile Giocondi and Christian Le Grimellec. **Temperature Dependence of the Surface Topography in Dimyristoylphosphatidylcholine/Distearoylphosphatidylcholine Multibilayers.** *Biophysical Journal*, 86(4) :2218–2230, 2004.
- [6] Philippe F. Devaux and Roger Morris. **Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes.** *Traffic*, 5(4) :241–246, 2004.

- [7] Pietro Cicuta, Sarah L. Keller, , and Sarah L. Veatch. **Diffusion of Liquid Domains in Lipid Bilayer Membranes.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(13) :3328–3331, 2007.
- [8] Alexandre Toulmay and William A. Prinz. **Direct imaging reveals stable, micrometer-scale lipid domains that segregate proteins in live cells.** *The journal of cell biology*, 202(1) :35–44, 2013.
- [9] Christian Eggeling, Christian Ringemann, Rebecca Medda, Günter Schwarzmann, Konrad Sandhoff, Svetlana Polyakova, Vladimir N. Belov, Birka Hein, Claas von Middendorff, Andreas Schönle, and Stefan W. Hell. **Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell.** *Nature*, 457 :1159–1162, 2008.
- [10] Dylan M Owen, Carles Rentero, Astrid Magenau, Ahmed Abu-Siniyeh, and Katharina Gaus. **Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms.** *Nature Protocols*, 7 :24–35, 2012.
- [11] Lydie Vamparys, Romain Gautier, Stefano Vanni, W.F. Drew Bennettand, D. Peter Tieleman, Bruno Antonny, Catherine Etchebest, and Patrick F.J. Fuchs. **Conical Lipids in Flat Bilayers Induce Packing Defects Similar to that Induced by Positive Curvature.** *Biophysical Journal*, 104(3) : 585–593, 2013.
- [12] Stefano Vanni, Lydie Vamparys, Romain Gautier, Guillaume Drin, Catherine Etchebest, Patrick F.J. Fuchs, and Bruno Antonny. **Amphipathic Lipid Packing Sensor Motifs : Probing Bilayer Defects with Hydrophobic Residues.** *Biophysical Journal*, 104(3) :575–584, 2013.
- [13] Sangeeta Nath, Julia Dancourt, Vladimir Shteyn, Gabriella Puente, Wendy M. Fong, Shanta Nag, Joerg Bewersdorf, Ai Yamamoto, Bruno Antonny, and Thomas J. Melia. **Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3.** *Nature Cell Biology*, 16(5) :415–424, 2014.
- [14] Yee-Hung M Chan and Steven G Boxer. **Model membrane systems and their applications.** *Current Opinion in Chemical Biology*, 11 :581–587, 2007.
- [15] Thomas Portet and Rumiana Dimova. **A New Method for Measuring Edge Tensions and Stability of Lipid Bilayers : Effect of Membrane Composition.** *Biophysical Journal*, 99(10) :3264–3273, 2010.

- [16] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, and E. Evans. **Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers.** *Biophysical Journal*, 79(1) :321–327, 2000.
- [17] J.M.C. Wessels and J.H. Veerkamp. **Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 291(1) : 190–196, 1973.
- [18] Evan Evans. **Adhesion of surfactant—membrane covered droplets : Special features and curvature elasticity effects.** *Colloids and Surfaces*, 43(2) :327–347, 1990.
- [19] Evan Evans and David Needham. **Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions.** *The Journal of Physical Chemistry*, 91(16) : 4219–4228, 1987.
- [20] W. Helfrich. **Elastic Properties of Lipid Bilayers : Theory and Possible Experiments.** *Journal of Biosciences*, 28 :693–703, 1973.
- [21] A. Tian and T. Baumgart. **Sorting of Lipids and Proteins in Membrane Curvature Gradients.** *Biophysical Journal*, 96(7) :2676–2688, 2009.
- [22] Beth Levine¹ and Daniel J. Klionsky. **Development by Self-Digestion : Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy.** *Developmental Cell*, 6 :463–477, 2004.
- [23] Noboru Mizushima, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, and Daniel J. Klionsky⁴. **Autophagy fights disease through cellular self-digestion.** *Nature*, 451 : 1069–1075, 2008.
- [24] Alan S.L. Wong, Zelda H. Cheung, and Nancy Y. Ip. **Molecular machinery of macroautophagy and its deregulation in diseases.** *Biochimica et Biophysica Acta*, pages 1490–1497, 2011.
- [25] C. de Duve. **Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles.** *Harvey Lecture*, 59 :49–87, 1965.
- [26] Beth Levine. **Eating Oneself and Uninvited Guests : Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense.** *Cell*, 120 :159–162, 2005.

- [27] Julian J. Lum, Daniel E. Bauer, Mei Kong, Marian H. Harris, Chi Li, Tullia Lindsten, and Craig B. Thompson. **Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis.** *Cell*, 120(2) : 237–248, 2005.
- [28] Maho Hamasaki, Takeshi Noda, Misuzu Baba, and Yoshinori Ohsumi. **Starvation Triggers the Delivery of the Endoplasmic Reticulum to the Vacuole via Autophagy in Yeast.** *Traffic*, 6(1) :56–65, 2005.
- [29] M. Chiara Maiuri, Einat Zalcvar, Adi Kimchi, and Guido Kroemer. **Self-eating and self-killing : crosstalk between autophagy and apoptosis.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 :741–752, 2007.
- [30] Devrim Gozuacik and Adi Kimchi. **Autophagy and Cell Death.** *Current Topics in Developmental Biology*, 78 :217–245, 2007.
- [31] Alfred J. Meijera and Patrice Codogno. **Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease.** *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (5-6) :411–425, 2006.
- [32] Beth Levine and Junying Yuan. **Autophagy in cell death : an innocent convict ?** *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10) :2679–2688, 2005.
- [33] Ingrid Kiššovaa, Maïka Deffieua, Victor Samokhvalova, Gisèle Veloursa, Jean-Jacques Bessoulec, Stéphen Manona, and Nadine Camougranda. **Lipid oxidation and autophagy in yeast.** *Free Radical Biology and Medicine*, 41 (11) :1655–1661, 2006.
- [34] Robin Mathewa, Vassiliki Karantza-Wadsworth, and Eileen White. **Role of autophagy in cancer.** *Nature Reviews Cancer*, 7 :961–967, 2007.
- [35] Masaaki Komatsu, Satoshi Waguri, Tomoki Chiba, Shigeo Murata, Jun ichi Iwata, Isei Tanida, Takashi Ueno, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Eiki Kominami, and Keiji Tanaka. **Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice.** *Nature*, 441 :880–884, 2006.
- [36] Beth Levin, Noboru Mizushima, and Herbert W. Virgin. **Autophagy in immunity and inflammation.** *Nature*, 469 :323–335, 2011.
- [37] Augustine Choy, Julia Dancourt, Brian Mugo, Tamara J. O’Connor, Ralph R. Isberg, Thomas J. Melia, and Craig R. Roy. **The Legionella Effector RavZ**

- Inhibits Host Autophagy Through Irreversible Atg8 Deconjugation.** *Science*, 338 :1072–1076, 2012.
- [38] C. de Duve. **Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles.** *Lecture*, 1959.
- [39] Dorothy F. Bainton. **The Discovery of Lysosomes.** *The Journal of Cell Biology*, 91(3) :66–76, 1981.
- [40] Robert E. Smith and Marilyn G. Farquhar. **Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland.** *The Journal of Cell Biology*, 31(2) :319–347, 1966.
- [41] Casper Paludan, Dorothee Schmid, Markus Landthaler, Martina Vockerodt, Dieter Kube, Thomas Tusch, and Christian Münz. **Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy.** *Science*, 307 :593–596, 2005.
- [42] Claudine Kraft and Sascha Martens. **Mechanisms and regulation of autophagosome formation.** *Current Opinion in Cell Biology*, 24(4) :496–501, 2012.
- [43] K Takeshige, M Baba, S Tsuboi, T Noda, , and Y Ohsumi. **Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction.** *The Journal of Cell Biology*, 119(2) :301–311, 1992.
- [44] Elizabeth L. Axe, Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, , and Nicholas T. Ktistakis. **Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum.** *The Journal of Cell Biology*, 182(4) : 685–701, 2008.
- [45] Dale W. Hailey, Prasanna Satpute-Krishnan Angelika S. Rambold and, Kasuri Mitra, Rachid Sougrat, Peter K. Kim, and Jennifer Lippincott-Schwartz. **Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation.** *Cell*, 141(4) :656–667, 2010.

- [46] Erwin Zinser and Günther Daum. **Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*, 11(6) :493–536, 1995.
- [47] Mitsuko Hayashi-Nishino, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Akihito Yamaguchi, Tamotsu Yoshimori, and Akitsugu Yamamoto. **A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation.** *Nature cell biology*, 11(12) :1433–1438, 2009.
- [48] Päivi Ylä-Anttila, Helena Vihinen, Eija Jokitalo, and Eeva-Liisa Eskelinen. **3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum.** *Autophagy*, 5(8) :1180–1185, 2009.
- [49] Roland L. Knorr, Rumiana Dimova, and Reinhard Lipowsky. **Curvature of Double-Membrane Organelles Generated by Changes in Membrane Size and Composition.** *PLoS ONE*, 7(3), 2012.
- [50] Hilla Weidberg, Elena Shvets, Tomer Shpilka, Frida Shimron, Vera Shinder, and Zvulun Elazar. **LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis.** *The EMBO Journal*, 29(11) :1792–1802, 2010.
- [51] Naonobu Fujita, Mitsuko Hayashi-Nishino, Hiromi Fukumoto, Hiroko Omori, Akitsugu Yamamoto, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori. **An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure.** *Molecular Biology of the Cell*, 19(11) : 4651–4659, 2008.
- [52] Justyna Sawa-Makarska, Christine Abert, Julia Romanov, Bettina Zens, Iosune Ibiricu, and Sascha Martens. **Cargo binding to Atg19 unmasks additional Atg8 binding sites to mediate membrane–cargo apposition during selective autophagy.** *Nature cell biology*, 16 :425–433, 2014.
- [53] Yang Cao and Daniel J Klionsky. **Physiological functions of Atg6/Beclin 1 : a unique autophagy-related protein.** *Cell Research*, 17 :839–849, 2007.
- [54] Daniel J. Klionsky, James M. Cregg, Jr. William A. Dunn, Scott D. Emr, Yasuyoshi Sakai, Ignacio V. Sandoval, Andrei Sibirny, Suresh Subramani, Michael Thumm, Marten Veenhuis, and Yoshinori Ohsumi. **A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes.** *Developmental Cell*, 5 :539–545, 2003.

- [55] Tanya M. Harding, Kevin A. Morano, Sidney V. Scott, and Daniel J. Klionsky. **Isolation and Characterization of Yeast Mutants in the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway.** *The Journal of Cell Biology*, 131(3) :591–602, 1995.
- [56] M. Thumm, R. Egner, B. Koch, M. Schlumpberger, M. Straub, M. Veenhuis, and D.H. Wolf. **Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 349(2) :275–280, 1994.
- [57] Miki Tsukada and Yoshinori Ohsumi. **Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Federation of European Biochemical Societies*, 333(1-2) :169–174, 1993.
- [58] Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori, and Yoshinori Ohsumi. **The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation.** *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27 :107–132, 2011.
- [59] Devrim Gozuacik and Adi Kimchi. **Autophagy and Cell Death.** *Current Topics in Developmental Biology*, 78 :217–245, 2007.
- [60] Eisuke Itakura and Noboru Mizushima. **Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins.** *Autophagy*, 6(6) :764–776, 2010.
- [61] Yoshinobu Ichimura, Takayoshi Kirisako, Toshifumi Takao, Yoshinori Satomi, Yasutsugu Shimonishi, Naotada Ishihara, Noboru Mizushima, Isei Tanida, Eiki Kominami, Mariko Ohsumi, Takeshi Noda, and Yoshinori Ohsumi. **A ubiquitin-like system mediates protein lipidation.** *Nature*, 408 :488–492, 2000.
- [62] Takayoshi Kirisako, Yoshinobu Ichimura, Hisashi Okada, Yukiko Kabeya, Noboru Mizushima, Tamotsu Yoshimori, Mariko Ohsumi, Toshifumi Takao, Takeshi Noda, , and Yoshinori Ohsumi. **The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway.** *The Journal of Cell Biology*, 151(2) :263–276, 2000.
- [63] Hagai Abeliovich, William A. Dunn Jr., John Kima, and Daniel J. Klionsky. **Dissection of Autophagosome Biogenesis into Distinct Nucleation**

- and Expansion Steps.** *The Journal of Cell Biology*, 151(5) :1025–1034, 2000.
- [64] Yakov Pa, Zvulun Elazar, and Deborah Fass. **Structure of GATE-16, Membrane Transport Modulator and Mammalian Ortholog of Autophagocytosis Factor Aut7p.** *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33) :25445–25450, 2000.
- [65] Vassiliy N Bavro, Maria Sola, Andreas Bracher, Matthias Kneussel, Heinrich Betz, and Winfried Weissenhorn. **Crystal structure of the GABAA-receptor-associated protein, GABARAP.** *EMBO reports*, 3(2) :183–189, 2002.
- [66] Joseph E. Coyle, Seema Qamar, Kanagalaghatta R. Rajashankar, and Dimitar B. Nikolov. **Structure of GABARAP in Two Conformations : Implications for GABAA Receptor Localization and Tubulin Binding.** *Cell press*, 33(1) :63–74, 2002.
- [67] Kenji Sugawara, Nobuo N. Suzuki, Yuko Fujioka, Noboru Mizushima, Yoshinori Ohsumi, and Fuyuhiko Inagaki. **The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8.** *Genes to Cells*, 9(7) :611–618, 2004.
- [68] Anjali Jotwani, Diana N. Richerson, Isabelle Motta, Omar Julca-Zevallos, and Thomas J. Melia. **Approaches to the Study of Atg8-Mediated Membrane Dynamics In Vitro.** *Methods in cell biology*, 108, 2012.
- [69] Takao Hanada, Nobuo N. Noda, Yoshinori Satomi, Yoshinobu Ichimura, Yuko Fujioka, Toshifumi Takao, Fuyuhiko Inagaki, , and Yoshinori Ohsumi. **The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy.** *Journal of biological chemistry*, 282(52) :37298–37302, 2007.
- [70] Anna Kaufmann, Viola Beier, Henri G. Franquelim, and Thomas Wollert. **Molecular Mechanism of Autophagic Membrane-Scaffold Assembly and Disassembly.** *Cell*, 156(3) :469–481, 2014.
- [71] Yoshinobu Ichimura, Yuko Imamura, Kazuo Emoto, Masato Umeda, Takeshi Noda, and Yoshinori Ohsumi. **In Vivo and in Vitro Reconstitution of**

- Atg8 Conjugation Essential for Autophagy.** *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39) :40584–40592, 2004.
- [72] Hitoshi Nakatogawa, Yoshinobu Ichimura, and Yoshinori Ohsumi. **Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion.** *Cell*, 130(1) :165–178, 2007.
- [73] Roland L. Knorr, Hitoshi Nakatogawa, Yoshinori Ohsumi, Reinhard Lipowsky, Tobias Baumgart, and Rumiana Dimova. **Membrane Morphology Is Actively Transformed by Covalent Binding of the Protein Atg8 to PE-Lipids.** *PLoS ONE*, 9(12), 2014.
- [74] Usha Nair, Anjali Jotwani, Jiefei Geng, Noor Gammoh, Diana Richerson, Wei-Lien Yen, Janice Griffith, Shanta Nag, Ke Wang, Tyler Moss, Misuzu Baba, James A. McNew, Xuejun Jiang, Fulvio Reggiori, Thomas J. Melia, and Daniel J. Klionsky. **SNARE Proteins Are Required for Macroautophagy.** *Cell*, 146(2) :290–302, 2011.
- [75] Hilla Weidberg, Tomer Shpilka, Elena Shvets, Adi Abada, Frida Shimron, and Zvulun Elazar1. **LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis.** *Developmental Cell*, 20(4) :444–454, 2011.
- [76] Aimin Yang, Dr. Yanping Li, Dr. Supansa Pantoom, Dr. Gemma Triola, and Dr. Yao-Wen Wu. **Semisynthetic Lipidated LC3 Protein Mediates Membrane Fusion.** *ChemBioChem*, 14(11) :1296–1300, 2013.
- [77] Douglas K. Struck, Dick Hoekstra, and Richard E. Pagano. **Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion.** *Biochemistry*, 20(14) :4093–4099, 1981.
- [78] Sophie Aimon, John Manzi, Daniel Schmidt, Jose Antonio Poveda Larrosa, Patricia Bassereau, and Gilman E. S. Toombes. **Functional Reconstitution of a Voltage-Gated Potassium Channel in Giant Unilamellar Vesicles.** *PLoS ONE*, 6(10), 2011.
- [79] Manuela Dezi, Aurelie Di Cicco, Patricia Bassereau, and Daniel Lévy. **Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18) :7276–7281, 2013.

- [80] Mark K. Doeven, Joost H. A. Folgering, Victor Krasnikov, Eric R. Geertsma, Geert van den Bogaart, and Bert Poolman. **Distribution, Lateral Mobility and Function of Membrane Proteins Incorporated into Giant Unilamellar Vesicles.** *Biophysical Journal*, 88(2) :1134–1142, 2005.
- [81] Nicoletta Kahya, Eve-Isabelle Pecheur, Wim P. de Boeij, Douwe A. Wiersma, and Dick Hoekstra. **Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion.** *Biophysical Journal*, 81(3) :1464–1474, 2001.
- [82] M. I. Angelova, S. Soléau, Ph. Méléard, F. Faucon, and P. Bothorel. **Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications.** *Progress in Colloid and Polymer Science*, 89 :127–131, 1992.
- [83] Isabelle Motta, Andrea Gohlke, Vladimir Adrien, Feng Li, Hélène Gardavot, James E. Rothman, and Frédéric Pincet. **Formation of giant unilamellar proteo-liposomes by osmotic shock.** *Langmuir*, 31 :7091–7099, 2015.
- [84] William J. Galush, Jeffrey A. Nye, and Jay T. Groves. **Quantitative Fluorescence Microscopy Using Supported Lipid Bilayer Standards.** *Biophysical Journal*, 95(5) :2512–2519, 2008.
- [85] Zhiping Xie, Usha Nair, Jiefei Geng, Maciej B. Szeffler, Edward D. Rothman, and Daniel J. Klionsky. **Indirect estimation of the area density of Atg8 on the phagophore.** *Autophagy*, 5(2) :217–220, 2009.
- [86] Ken ichirou Akashi, Hidetake Miyata, Hiroyasu Itoh, and Jr. Kazuhiko Kinoshita. **Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their Characterization under an Optical Microscope.** *Biophysical Journal*, 71(6) :3242–3250, 1996.
- [87] Christian Eggeling, Christian Ringemann¹, Rebecca Medda, Gunter Schwarzmann, Konrad Sandhoff, Svetlana Polyakova, Vladimir N. Belov, Birka Hein, Claas von Middendorff, Andreas Schonle, and Stefan W. Hell. **Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell.** *Nature*, 457 :1159–1163, 2003.
- [88] Sarah L. Veatch and Sarah L. Keller. **Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol.** *Biophysical Journal*, 85(5) :3074–3083, 2003.

-
- [89] Y. Gambin, R. Lopez-Esparza, M. Reffay, E. Sieracki, N. S. Gov, M. Genest, R. S. Hodges, and W. Urbach. **Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7) :2098–2102, 2006.
- [90] Aurélien Roux, Gerbrand Koster, Martin Lenz, Benoît Sorre, Jean-Baptiste Manneville, Pierre Nassoya, and Patricia Bassereau. **Membrane curvature controls dynamin polymerization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9) :4141–4146, 2010.
- [91] Robert J. Rubin and Yi der Chen. **Diffusion and redistribution of lipid-like molecules between membranes in virus-cell and cell-cell fusion systems.** *Biophysical Journal*, 58(5) :1157–1167, 1990.
- [92] Andrew Callan-Jones, Benoît Sorre, and Patricia Bassereau. **Curvature-Driven Lipid Sorting in Biomembranes.** *Cold spring harbor perspectives in biology*, 2011.
- [93] John Manzi Bruno Goud Jacques Prost Patricia Bassereau Benoît Sorre, Andrew Callan-Jones and Aurélien Roux. **Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1) :173–178, 2012.

*Article***Formation of giant unilamellar proteo-liposomes by osmotic shock.**

Isabelle Motta, Andrea Gohlke, Vladimir Adrien, Feng Li, Hélène Gardavot, James E. Rothman, Frédéric Pincet.

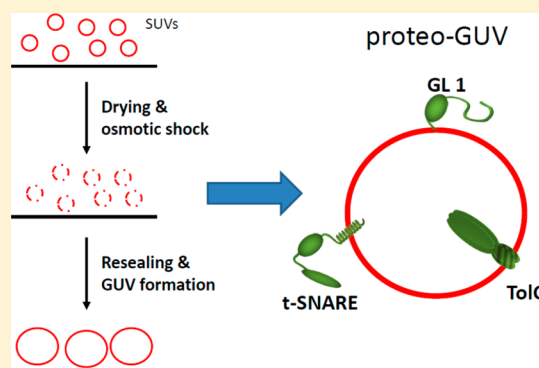
Langmuir, 21 :7091-7099, 2015.

Formation of Giant Unilamellar Proteo-Liposomes by Osmotic Shock

Isabelle Motta,^{†,⊥} Andrea Gohlke,^{†,‡,⊥} Vladimir Adrien,^{†,§} Feng Li,[‡] Hélène Gardavot,[†] James E. Rothman,[‡] and Frederic Pincet^{*,†,‡}[†]Laboratoire de Physique Statistique, Ecole Normale Supérieure de Paris, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris Diderot, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8550, 24 rue Lhomond, 75005 Paris, France[‡]Department of Cell Biology, Nanobiology Institute, School of Medicine, Yale University, 333 Cedar Street, New Haven, Connecticut 06520, United States[§]Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, Université Paris Descartes, CNRS, UMR 8015, Paris, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Giant unilamellar vesicles (GUVs), composed of a phospholipid bilayer, are often used as a model system for cell membranes. However, the study of proteo-membrane interactions in this system is limited as the incorporation of integral and lipid-anchored proteins into GUVs remains challenging. Here, we present a simple generic method to incorporate proteins into GUVs. The basic principle is to break proteo-liposomes with an osmotic shock. They subsequently reseal into larger vesicles which, if necessary, can endure the same to obtain even larger proteo-GUVs. This process does not require specific lipids or reagents, works under physiological conditions with high concentrations of protein, the proteins remain functional after incorporation. The resulting proteo-GUVs can be micromanipulated. Moreover, our protocol is valid for a wide range of protein substrates. We have successfully reconstituted three structurally different proteins, two trans-membrane proteins (TolC and the neuronal t-SNARE), and one lipid-anchored peripheral protein (GABARAP-Like 1 (GL1)). In each case, we verified that the protein remains active after incorporation and in its correctly folded state. We also measured their mobility by performing diffusion measurements via fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments on micromanipulated single GUVs. The diffusion coefficients are in agreement with previous data.



■ INTRODUCTION

The backbone of cellular membranes is made of a lipid bilayer that hosts and regulates protein machineries transiently or permanently. Protein activities are affected by the membrane properties, and the embedded proteins in turn can influence the characteristics of the membrane. These cross-interactions play a huge part in many different biological processes. To study these cross-interactions *in vitro*, various membrane models were developed to mimic *in vivo* systems. Common examples are supported bilayers, unilamellar vesicles (50 nm–100 μ m), and nanodiscs (reviewed in ref 1). Giant unilamellar vesicles (GUVs) (3–100 μ m), in particular, have a prominent role because of their large size, resembling the dimensions of a cell, making them an appealing tool for micromanipulation and microscopy studies.

Several protocols have been developed to form GUVs. The most common method is to grow them from a dry lipid film by electroformation in sucrose or buffer solutions on platinum wires and indium tin oxide-coated glass (ITO glass),^{2–5} but other protocols have been published which grow GUVs, for example, by swelling in solution^{6,7} or from gel films,^{8,9} by infrared heating,¹⁰ solvent exchange,¹¹ evaporation,¹² or the water-in-oil emulsion technique.^{13,14}

In the past decade, it appeared that making proteo-GUVs, i.e., GUV containing proteins, was a very challenging task. Several protocols have been proposed,^{15–26} mostly based on the ones established for protein-free GUVs. All of these approaches have been successfully used with specific proteins.

Here we describe a new protocol for forming proteo-GUVs that is applicable to three different types of proteins: a lipid-anchored protein named γ -aminobutyric acid receptor-associated protein (GL1), a single transmembrane protein called t-SNARE (a target-membrane-located soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor composed of Syntaxin 1 and SNAP25), and a channel protein named TolC required to form a homotrimer to be able to insert into membranes (Figure 1).

The general idea of this new method that we call the osmotic shock method is based on the hydration of dried small proteo-liposomes with pure water supposedly resulting in an osmotic shock that triggers the formation of proteo-GUVs. The unilamellarity of these proteo-GUVs has been checked by

Received: March 31, 2015

Revised: June 1, 2015

Published: June 3, 2015

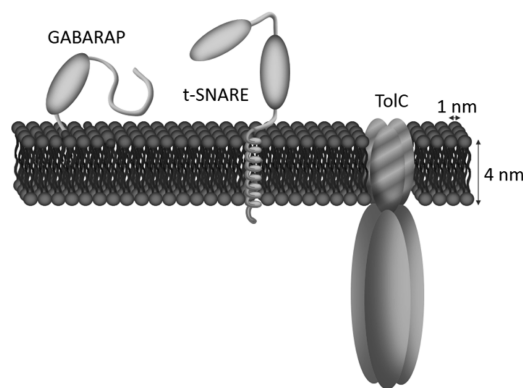


Figure 1. Schematics of GL1, t-SNARE, and TolC. GL1 is a protein anchored to a DOPE lipid, t-SNARE has a single trans-membrane α -helix, and TolC is a trimeric barrel establishing a 14-nm-long pore including a transmembrane region made of a 4-nm-wide β -barrel complex. The plain ellipsoids represent a structured part of the protein outer membrane regions (including both Syntaxin1A and SNAP25 helices in the case of t-SNARE).

fluorescence. The main advantages of the osmotic shock method are that the density of the proteins is well controlled (up to a few tenths of a percent), the functionality of the protein is conserved, the production costs are low, and the final proteo-GUVs can be prepared in any saline buffer at physiological osmolality. The resulting GUVs can easily be separated and micromanipulated. The diffusion coefficients of the reconstituted proteins obtained by fluorescence recovery after photobleaching experiments gave consistent results with previous data.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Phospholipids dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC), dioleoyl-phosphatidylserine (DOPS), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol, dioleoyl-phosphoethanolamine-nitro-benzoxadiazolyl (NBD-PE), and dioleoyl-glycero-phosphoethanolamine-lissamine rhodamine B sulfonyl (LR-PE) were purchased from Avanti Polar Lipids. ATTO647-dioleoyl-phosphoethanolamine (DOPE-ATTO647), ATTO488-dioleoyl-phosphoethanolamine (DOPE-ATTO488), and dye ATTO488 maleimide (ATTO488) were purchased from ATTO-Tec. Alexa Fluor488 C5-maleimide (Alexa488) and Alexa Fluor 647 C2-maleimide were purchased from Life Technologies. Trizma hydrochloride (TrisHCl), sodium chloride, glycerol, octyl β -D-glucopyranoside, and TCEP were purchased from Sigma-Aldrich. 1,4-Dithiothreitol (DTT) was purchased from Roche. Dialysis cassettes were purchased from Thermo Fisher. Petri dishes with a glass bottom (Mattek) were used for the experiments. PreScission protease, a HiLoad Superdex 75 column, and PD MidiTrap G-25 columns were purchased from GE Healthcare.

Protein Expression and Purification. GL1-like-1 (hereafter referred to simply as GL1) is a lipid-anchored protein. In order to facilitate our GUV experiments, we have mutated GL1 to include an amino-terminal cysteine (for dye-labeling described below), and we have truncated GL1 at the COOH terminus such that the reactive glycine (G116) is fully exposed and ready for interaction with Atg7 and Atg3. Atg3 and Atg7 are two autophagic enzymes involved in the ubiquitin-like reaction that covalently bind GL1 to the membrane. GL1, Atg3, and Atg7 were then expressed and purified as previously described.²⁷

The transmembrane t-SNARE complex, which includes full-length, wild-type mouse His6-SNAP25 and rat Syntaxin1A, was produced by the expression of polycistronic plasmid pTW34 in the BL-21 gold

(DE3) *Escherichia coli* bacterial strain and purified as described before.^{28,29}

Transmembrane t-SNARE S193C with a single cysteine residue was mutated using plasmid pTW34 as the template. All of the native cysteine residues on Syntaxin1A and SNAP25 were mutated to serine, and the serine of residue 193 on Syntaxin1A was mutated to cysteine using the QuickChange site-directed mutagenesis kit from Stratagene. The resultant plasmid was expressed in the BL-21 gold (DE3) *Escherichia coli* bacterial strain and purified as described before.^{29,30}

The plasmid for the cytosolic domain of VAMP2 (CDV S28C) was produced by cloning residues 1 to 96 of VAMP2 into a pCDFDuet-1 vector containing GST-PreScission-CDV,^{29,31} followed by a single site-specific point mutation at residue 28 (S28C) using the QuickChange site-directed mutagenesis kit from Stratagene. Similar to a previous report,^{30,32} this plasmid was expressed in the BL21 gold (DE3) *Escherichia coli* bacterial strain and purified with a buffer containing 25 mM Tris (pH 7.4), 400 mM KCl, 10% glycerol (w/v), and 1 mM TCEP. The GST tag was cleaved by incubating the protein (attached to glutathione beads) with PreScission protease overnight at 4 °C. The protein was eluted and then purified by size exclusion chromatography on a HiLoad Superdex 75 (16/60, GE Healthcare) column.

The TolC protein was expressed in *E. coli* strain C43 (DE3) and purified in β -OG following a protocol previously described and valid for most outer-membrane factors of tripartite bacterial efflux pumps.³³

Protein Labeling. GL1 was labeled with Alexa Fluor488 C5-maleimide through the amino-terminal cysteine. GL1 protein (100 μ M) was mixed with 600 μ M TCEP. After 5 min of incubation at room temperature, the fluorescent dye (800 μ M) dissolved in DMSO was added. The mixture was protected from light and slowly checked at room temperature for 2 h or overnight at 4 °C. The labeled GL1 was then dialyzed (100 mM NaCl, 50 mM trizma hydrochloride, 1 mM DTT) overnight at 4 °C to remove the excess free dye in order to reduce the background fluorescence.

The transmembrane t-SNARE S193C and soluble CDV S28C were labeled with Alexa Fluor 488 C5-maleimide or Alexa Fluor 647 C2-maleimide (Life Technologies), similarly to a previous report.²⁹ The protein was first reduced by incubating with 4 mM TCEP for 30 min at 4 °C with gentle rotation and centrifugation at 14 000 rpm for 20 min at 4 °C to remove any precipitation. Fluorescent dye was added to the protein solution at a dye/protein = 3:1 molar ratio, and the mixture was incubated for 1 to 2 h at room temperature with gentle rotation. Unreacted dye was removed by passing through the PD MidiTrap G-25 column (GE Healthcare) three times to reduce background fluorescence.

TolC was labeled with Alexa488 through its primary amine sites. The protein was diluted at a 2 mg/mL concentration in a sodium phosphate buffer (20 mM NaPi pH 8, 150 mM NaCl, 0.9% (w/v) β -OG). We added sodium bicarbonate at a concentration of 1 M in a 1:10 (v/v) ratio in order to raise the pH and improve the labeling reaction. We added the dye (stocked at -20 °C dissolved in DMSO at 1 mg/mL) in a ratio of 30:1 (mol/mol) dye per protein. The solution was mixed at room temperature for 2.5 h. The resulting labeled protein was eluted in a gel-filtration column (Econo-Pac 10DG columns, Bio-Rad) to remove excess nonbound fluorophores in order to reduce the background fluorescence. The labeling ratio was verified by spectrometry and was between 0.7 and 1 dye per protein. Labeled proteins were then dialyzed (150 mM Tris pH 8 300 mM NaCl, 0.9% (w/v) β -OG).

Formation of Small Liposomes. In the case of the protein-free small liposomes, the phospholipid mixtures (POPC/POPS/DOPE-Rhodamine 89:10:1 mol %) and the composition of the GUVs with two liquid phases (bottom center in panel 5, Figure 2) consisting of DOPC 40 mol %, DPPC 40 mol %, and cholesterol 20 mol % were initially mixed in glass tubes and dried with nitrogen gas and subsequently under vacuum. The dried lipid film was resuspended in buffer (100 mM NaCl) to a final concentration of 3 mM lipid by vortex mixing for 15 min to form small liposomes.

The strategy for the formation of small proteo-liposomes depends upon the type of interaction of the protein with the membrane.

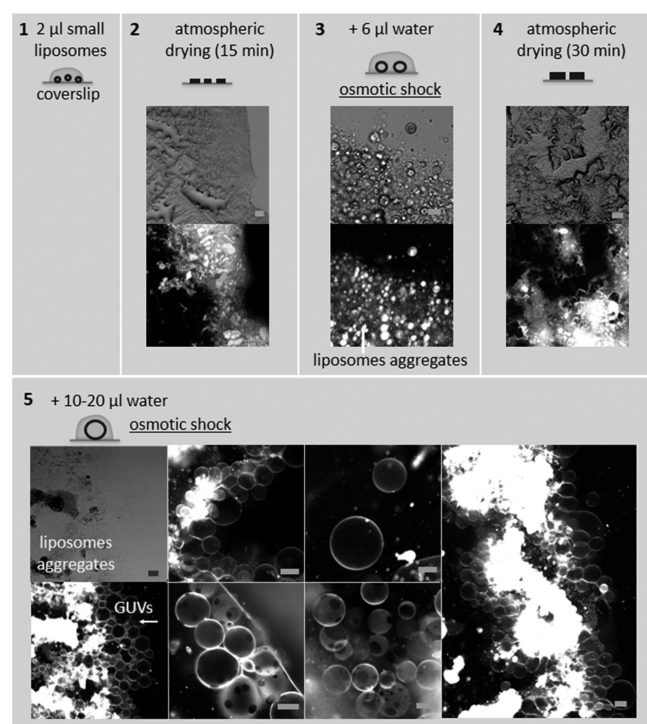


Figure 2. Protein-free GUV preparation from small liposomes. A 2 μL drop of the 3 mM lipid small liposomes solution in buffer is deposited on a clean coverslip (1) and left to dry at room temperature on a laboratory bench. After drying, the small liposomes tend to form aggregates (2). A 6 μL water drop is placed on top of the dry sample, triggering the formation of small aggregated GUVs by osmotic shock (3). The sample is left to dry a second time (4) before being rehydrated with 10–20 μL of water (5). Larger and more GUVs are formed. If required, the drying/rehydration cycle can be repeated to improve the number and size of the GUVs. The composition of the GUVs with one liquid phase (top and bottom left in 5) was POPC 89 mol %, POPS 10 mol %, DOPE-Rohamine 1 mol %, and the composition of the GUVs with two liquid phases (bottom center in 5) was DOPC 40 mol %, DPPC 40 mol %, cholesterol 20 mol %. The images on top in 2, 3, and 4 and on the top left in 5 were recorded using transmission microscopy, the images on the bottom in 2, 3, and 4 and the entire image in 5 except for the top left were recorded using confocal microscopy (ATTO647 fluorescence). Scale bars: 10 μm .

Membrane-associated protein GL1 is anchored to liposomes via the lipidation reaction described before.²⁷ Briefly, the phospholipid mixture (30% DOPE, 69.5% DOPC, and 0.5% DOPE-ATTO647 in mol %) was mixed in a glass tube, dried with nitrogen gas, and subsequently dried under vacuum. Here, DOPE is necessary for the lipidation process of the protein. The dried lipid film was then resuspended in buffer (100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, pH 7.6) to a final concentration of 10 mM lipid and vortex mixed for 15 min. To anchor the GL1 protein on the lipid, we mixed liposomes (3 mM lipid), 10 μM GL1, 1 mM DTT, 10 μM Atg3, 10 μM Atg7, and 1 mM ATP and incubated the mixture for 90 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Residual glycerol was removed from the proteo-liposomes mixture by dialysis through a 7 kDa pore membrane overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$.

The reconstitution of t-SNAREs and TolC, which are both embedded in the membrane via their helical transmembrane domain, into liposomes was basically done as described in ref 34 with slight modifications. Briefly, lipids (DOPC/DOPS/Atto647-DOPE, 91.2:8:0.8 mol %) were dried under nitrogen/vacuum and then rehydrated with purification buffer containing 0.9 to 1% octylglucoside and the respective protein. The inclusion of DOPS is a common addition when reconstituting t-SNAREs. After 20 min of shaking, rapid dilution was done by the addition of reconstitution buffer (t-SNARE:

20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.4; TolC: 150 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8.0) to dilute the detergent concentration below the critical micellar concentration and mixed for another 20 min. The resulting proteo-liposomes (final lipid concentration: 3 mM) were dialyzed overnight in reconstitution buffer to remove the detergent.

Sucrose of lipid (0.2 mM) was added to the proteo-liposomes to protect the protein during the GUV-formation process.¹⁷

GUV Formation. Osmotic Shock Hydration. The coverslip glass was cleaned with isopropanol and a dust-free tissue and dried with pressurized nitrogen. A 2 μL drop of small liposomes solution was placed on the coverslip and dried at room temperature under atmospheric pressure. Then, it was rehydrated with 6 μL deionized water and then dried again under the same conditions. In the next step the lipid film is rehydrated once more with a larger deionized water volume of 10–20 μL and observed under the microscope. GUVs grew instantly from the rehydrated lipid films mainly in the areas with a high concentration of lipids (Figure 2). The two sequential drying–rehydration cycles favor the formation of larger and more uniform GUVs.

The temperature during the hydration steps should be above the highest transition temperature of the dried lipids.

Electroformation. GUVs were grown following the protocol of Angelova et al.³⁵ Briefly, 20 μL of a 1 mM lipid stock solution in chloroform was dried on an ITO plate under vacuum and rehydrated with 2 mL of 200 mM sucrose. GUV formation was performed at 8 Hz and 1.1 V for 2 h.

Unilamellarity. To prove that the giant liposomes produced using our proposed protocol are unilamellar we applied an already-published method by Akashi et al.⁷ based upon the quantification of the intensity of the incorporated fluorescently labeled lipids in the membrane. In detail, NBD-PE or Atto647-PE is included in the membrane of the protein-free and proteo-GUV at 0.8 to 1 mol % lipids. The averaged fluorescence intensity of the membrane of the GUV is measured by confocal microscopy and subtracted by the averaged background signal. The resulting intensities are plotted as a function of the liposome size and also their occurrence.

Fluorescence Microscopy. GUVs were detected using bright field and confocal microscopy at room temperature. The experiments were carried out on an SP5 confocal microscope from Leica equipped with 10 \times and 20 \times air objectives, argon (488/543 nm) and HeNe (633 nm) lasers, and a 488/543/633 beam splitter. Image analysis was done with the LAS AF software from Leica.

Micromanipulation and FRAP. Micromanipulation was used to maneuver independent GUVs and keep them static in solution. The internal diameter of the micropipettes was about ~ 5 μm , and to prevent the adhesion of the GUV to the glass, the pipet was incubated in a solution of 10% BSA in pure water prior to use for 15 min. The aspiration to maintain the GUVs was controlled by hydrostatic pressure and kept at 20 Pa.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was performed on GUVs to monitor the diffusion coefficient of fluorescent lipid and fluorescent protein on the membrane. The fluorescence recovery curves were then analyzed with Mathematica 10 or Scilab 5.4 to get the tau coefficient, with tau being the recovery time.

RESULTS

Principles of the Osmotic Shock Method for GUV Formation. The osmotic shock method is based upon the assumption that the membranes of the dried small liposomes have to be disrupted in order to form GUVs. This disruption is induced by the generation of an osmotic shock leading to a surface tension larger than the lysis tension (discussed below), thereby destroying the integrity of the membrane: instead of rehydrating with buffer as is done in other previously published protocols,^{3,4,15,23} pure water is used to rehydrate. We assume that the osmotic shock spontaneously and synchronously breaks the liposomes, thereby generating floating membranes that merge and reseal as soon as they can, thus forming larger

membrane surfaces. Together with the lipids the salt of the small liposome buffer is also rehydrated, creating a physiological environment for the GUVs.

The basic protocol is as follows: A 2 μL drop of a 3 mM small liposomes solution is placed on the coverslip and dried at room temperature under atmospheric pressure. It is rehydrated with 6 μL of deionized water and dried again under the same conditions. In the next step, the lipid film is rehydrated once more with a larger deionized water volume of 10–20 μL and observed under the microscope. GUVs grow instantly from the rehydrated lipid films mainly in the areas with a high concentration of lipids (Figure 2). Several drying hydration cycles usually improve the quality and yield of the GUVs. This might be explained by the new reorganization of the lipids during each drying/hydration cycle resulting in more and larger GUVs.

Conditions for the Osmotic Shock Method. Our proposed GUV formation protocol is based on an osmotic shock which seems to partially break the membrane of the dried liposomes, resulting in the formation of GUVs. This new method is applicable under a broad range of conditions. We characterized the properties and yield of protein-free GUVs with regard to the lipid concentration, the volume of liposomes to be dried, the liposome-buffer composition and concentration, the water volume for hydration, and the drying procedure (Figure S1).

The lipid concentration modulates the thickness and density of the dried liposome film. A lipid concentration that is too high forms a thick layer of liposome aggregates and GUVs form only at the edge of these aggregates, whereas a lipid concentration that is too small would be washed away during the hydration step. Lipid concentrations in the range of 3–10 mM result in the formation of GUVs at the edge and also in the center of the liposome film. Aimon et al.¹⁵ also used a 3 mM lipid concentration when drying liposomes prior to electroformation. Therefore, all of our experiments were performed at a lipid concentration of 3–10 mM, and the volume of the deposited drop is 2 μL .

We also tested several liposome-buffer compositions. Tris-HCl (50 mM) with up to 300 mM NaCl or KCl in the liposome buffer leads to reasonable number of GUVs, whereas all of the buffers made with a concentration of sucrose, glucose, Nycodenz, or glycerol above a few tens of mM did not work. We successfully obtained GUVs with up to 4 mM sucrose. Looking at the drying film it seems that these sugar components prevent sufficient drying of the liposome drop and form a thin layer above the lipid film that protects the liposomes, leading to an inhibition/reduction of the osmotic shock during the osmotic shock step (Figure S2). For salt concentrations higher than 500 mM liposome buffer, no formation of GUVs can be detected. To retain the physiological conditions, we worked with ionic concentrations of between 100 and 300 mM. The volume of water applied for the rehydration must cover the area of dried liposomes.

Additionally, we found that several consecutive sessions of drying and hydration of the dried liposome film increase the number and quality of grown GUVs. After the first hydration the GUVs are small (around 5 μm), and only a few can be observed. But after a second drying and sequential hydration step the number of GUVs increases drastically, and their diameter is around 40 μm . Depending on the conditions, one to three consecutive drying and rehydration steps are recommended.

In conclusion, we chose the following parameters to form protein-free and proteo-GUVs: 3–10 mM lipids, 150 mM NaCl salt in tris buffer (pH 7.4), 2 μL drop, two drying–hydration cycles, and 6 μL of water during the first hydration and then 10 μL .

Formation of Proteo-GUVs by Osmotic Shock. In this section, we present how the osmotic shock method is used to incorporate proteins into the GUVs. First, small liposomes containing the incorporated protein were produced. Our protocol does not give a generic method to make small proteo-liposomes but a generic method to form proteo-GUVs starting from small proteo-liposomes. Depending on the protein, the method used to form small proteo-liposomes is different. In the next few paragraphs, we present briefly the proteins we used—GL1, TolC, and t-SNARE (Figure 1)—and how they were incorporated into liposomes.

GL1 is a member of the Atg8/LC3 protein family and is active during the autophagy process, an intracellular degradation mechanism. In the autophagic organelles, the autophagosome, GL1 is responsible for the regulation of membrane dynamics. This peripheral protein is anchored to the membrane of the autophagosome through the covalent attachment of its C-terminal end to the phosphatidylethanolamine (PE) lipid headgroup via an ubiquitin-like reaction involving autophagic enzymes Atg7 and Atg3.²⁷ This lipidation can be efficiently recapitulated in vitro on very small liposomes but is an inherently curvature-sensitive process and thus does not occur on larger flat membrane structures such as GUVs. Atg3 proteins need first to bind to the membrane through packing defects before transferring GL1 to a PE lipid. However, the low curvature of the GUV membrane and the low concentration of PE lipids (30 mol %) limit the presence of lipid packing defects and thus the binding of Atg3.

Neuronal t-SNARE is a protein complex with a single α -helix transmembrane domain that is involved in membrane fusion. It is composed of Syntaxin 1 and SNAP-25 and is located on the target plasma membrane. Calcium-dependent synaptic vesicle fusion in neurons is mediated by the formation of SNARE complexes. During the docking and subsequent fusion process, the vesicle and target membrane are brought into close proximity by pairing vesicle-associated v-SNAREs with cognate t-SNAREs on target membranes.³⁶

TolC is an integral membrane protein and part of a heterotrimer that together comprise a major multidrug efflux pump in *Escherichia coli*, AcrA-AcrB-TolC. AcrA and AcrB are embedded in the inner membrane of the bacteria whereas TolC is an outer-membrane protein (OMP). TolC itself is composed of 3 monomers of 428 amino acids. The formation of this homotrimer is required for TolC to insert into the membrane, as its transmembrane domain is a β -barrel constituted of three protomers contributing four β -strands each. Once the substrate has been recruited by the inner-membrane proteins, it is exported through TolC which plays the role of a channel leading to the extracellular space. Its global geometry is a cylinder with a diameter of approximately 40 Å and a height of 140 Å.³⁷

In general, it is quite challenging to incorporate membrane proteins which contain one or several transmembrane domains as they span the whole bilayer. Concerning our biological systems, our studied proteins (t-SNARE and TolC) are complex structures consisting of two or more subunits. Therefore, it is quite challenging to keep these units assembled and in their naturally folded state during the drying processes.

Using small proteo-liposomes containing one of the three proteins, we produced proteo-GUVs in the same way as described for the protein-free GUVs (Figure 2). We observed their presence by labeling the proteins with an Alexa488 fluorophore. In all three cases the proteins were detected to be colocalized with the lipid-fluorophore label of the membrane (Figure 3).

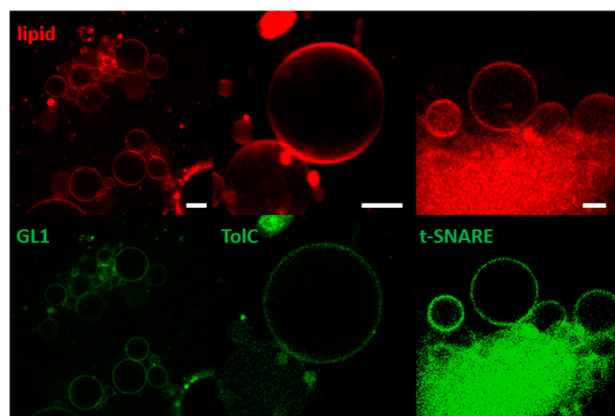


Figure 3. Protein-GUVs formed with the osmotic shock method using GL1, t-SNARE, and TolC labeled with Alexa488 (green). The fluorescent lipid is DOPE-Atto 647 (red). Scale bars are 10 μm .

Quantification of the Protein Concentration in the Proteo-GUVs. The amount of protein incorporated into the membrane was quantified on the basis of the protocol described by Galush et al.³⁸ using the fluorescence signal of Alexa488-labeled proteins. To the best of our knowledge, no fluorescent lipid with Alexa488 exists to make a fluorescence scale, so we used soluble ATTO488 dye and the DOPE-ATTO488 lipid to set a fluorescence scale. First we established a ratio of fluorescence intensity between the Alexa488 and ATTO488 in the bulk. The measurement settings were kept identical, and several dye concentrations were measured (Figure S3.A.). We found the ratio of the fluorescence intensities of ATTO488/Alexa488 to be 2. Then, GUVs were made with different molar ratios of DOPE-ATTO488 (Figure S3.B.) to get a scale of fluorescence intensity with the DOPE-ATTO488 percentage in the membrane. Finally, considering the ratio ATTO488/Alexa488, we calculated the amount of incorporated GL1. Knowing that 5% of the GL1 proteins are labeled and using the standard we established, we found a GL1 ratio on the membrane of 1 per 500 lipids and the ratio between the loaded proteins and the lipids is 1 protein per 300 lipids, so 60% of the initially added GL1 protein gets incorporated onto the GUV membrane. In the case of the t-SNAREs, we found that about 90% of the loaded protein gets incorporated when starting with an initial concentration of 1 protein per 500 lipids (Figure S3C.), of which about 86% were labeled. We are aware that the fluorescence intensities of Alexa488 and Atto647 in their soluble forms might be slightly different from those in their bound forms. However, this method provides a good approximation of the protein concentration, which is what we are looking for.

Activity of Proteins Incorporated into GUVs. In the next step, we determined if the membrane proteins remain active after their incorporation into GUVs.

GL1-PE, incorporated into small liposomes or present on natural biological membranes, is a substrate for protease RavZ,

an antiautophagy factor produced by the bacterium *Legionella pneumophila*.³⁹ Importantly, neither GL1 alone nor GL1-PE solubilized in detergent is recognized by RavZ, thus the RavZ proteolytic activity on GL1-PE can be used as a proxy for assessing whether GL1-PE retains its normal lipidation and membrane incorporation-dependent fold.³⁹ Here, we tested whether our reconstitution approach maintained the folding of membrane-embedded GL1-PE by incubating the proteo-GUVs with 10 nM recombinant RavZ at room temperature for 40 min. The fluorescence signal of the protein on the proteo-GUV membrane was reduced by half, as expected when proteins from the outer leaflet were cleaved while proteins bound to the inner leaflet remained protected (Figure 4 A)

To test the functionality of t-SNARE, proteo-GUVs and protein-free GUVs were incubated with the soluble domain of Alexa647-labeled v-SNAREs (CDV), its cognate binding partner (Figures 4B and S4).³⁶ CDV binds specifically to the proteo-GUVs, which proves that t-SNAREs are properly folded. It has been reported before that t-SNAREs usually tend to aggregate when reconstituted into GUV, losing their activity⁴⁰ and therefore usually requiring more extensive protocols to be reconstituted.⁴¹ This proof of functionality does not give information about the site fraction of the t-SNAREs bound to the CDV. However, it gives a good estimation of whether the t-SNAREs remain active after reconstitution using a simple and fast protocol.

The transmembrane part TolC is a 12-stranded right-twisted β -barrel in which each of the monomers takes part.³⁷ Incorrect folding of TolC would prevent the correct insertion of the protein as a homotrimer into the membrane. Because we observe that TolC enters and stays within the membrane of the proteo-GUV, its transmembrane part probably remains correctly folded. TolC is a channel protein, so we assume that, when correctly folded, it remains functional. This is the best functionality test we can easily propose because TolC is part of a three-protein complex (AcrA–AcrB–TolC) forming an efflux pump embedded in two adjacent bilayers. Outer-membrane protein TolC alone is in a closed state and opens with the help of its inner-membrane partner AcrA. Showing that it can function as a channel is therefore very complicated experimentally without reconstituting the whole efflux pump within a two-bilayer system.

Unilamellarity. To prove that our proposed protocol produces unilamellar giant liposomes, we applied an already-published method by Akashi et al.⁷ quantifying the intensity of the incorporated fluorescently labeled lipids in the membrane. The measurement results in a distribution of separate groups of fluorescence intensities each belonging to a distinct number of lipid layers in the liposome, with unilamellar liposomes exhibiting the lowest intensity. In our case 82% of the analyzed protein-free giant liposomes turned out to be unilamellar. In the case of the protein-reconstituted GUVs, 70% of the vesicles containing GL1 were unilamellar, whereas when t-SNAREs are reconstituted the unilamellarity of the liposomes is about 85% (Figure S5).

Micromanipulation of Proteo-GUVs and Diffusion of the Protein in the Membrane. Proteo-GUVs obtained with the osmotic shock method can easily be separated and micromanipulated: they can be either caught directly from the hydrated lipid/protein film or can first be gently detached from the lipid film by generating a flow in the buffer drop and then caught with a pipet (Figure 5A). To compare the mobility of the lipids (DOPE-NBD) in the GUVs grown by osmotic

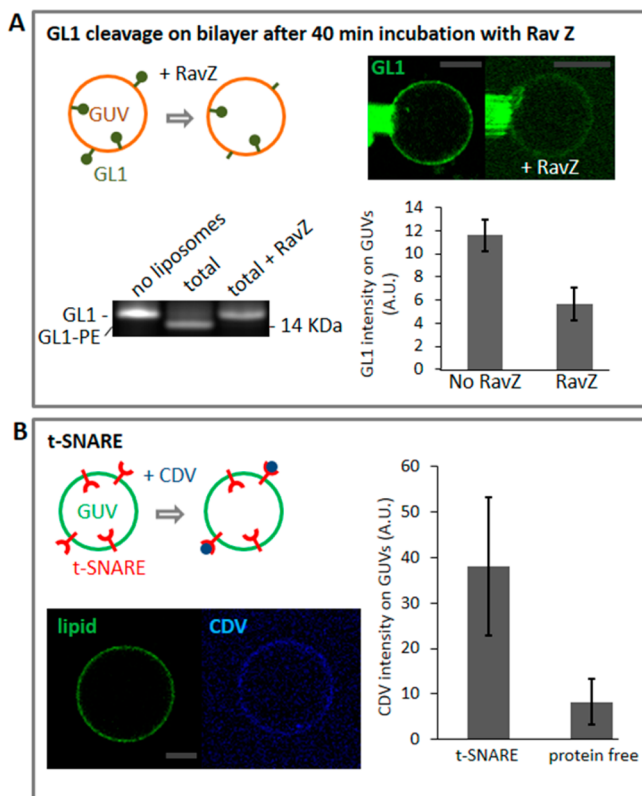


Figure 4. Functionality of the protein after the osmotic shock method. (A) Reconstituted protein GL1-Alexa488 is cleaved from the membrane by RavZ (10 nM) after 40 min of incubation at room temperature. The gel shows the cleavage of GL1 from the liposome membrane (bottom left). In the first line, GL1 alone was loaded. In the second line, the enzymatic reaction was loaded, so the lipidated GL1 migration is shifted. In the third line, the enzymatic reaction plus RavZ was loaded. GL1 is evenly distributed between the inner and outer leaflets of the proteo-GUVs, and only half of the protein is accessible to RavZ, leading to a 50% reduction in the fluorescence intensity of GL1. (See micromanipulated GUV on the top left and the evaluation of the fluorescence intensity on the bottom left, with statistics on seven GUVs.) In conclusion, GL1 remains properly folded after the drying/hydration cycles. (B) Resuspended t-SNARE-GUVs labeled with NBD-PE are incubated in 1 μ M Alexa647-CDV for 60 min at 37 $^{\circ}$ C. The left panel shows the lipid fluorescence of the NBD-PE signal (green) of the GUV and the fluorescence intensity of bound CDV-Alexa647 (blue) with respect to that of the t-SNAREs. The right panel shows the average fluorescence intensity of the Alexa647 signal of the CDV at t- and protein-free GUVs. (See Figure S4 for a picture of protein-free GUVs.) Scale bars are 10 μ m. The data show that CDV is binding specifically to the GUVs containing t-SNAREs, proving their functionality after reconstitution (15 GUVs were analyzed for each species). In general, there were no biochemical differences detected when working with micromanipulated or resuspended GUVs. The error bars in the graphs represent the standard deviation from the mean.

shock with that in GUVs made by another method such as electroformation, we measured their diffusion coefficient in the membrane by FRAP. We found a similar diffusion coefficient of $6.9 \pm 1.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the osmotic shock method and $7.2 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for electroformed GUVs. Therefore, the mobilities of the lipids in the GUVs formed by our proposed method and electroformation are the same, indicating that both membranes have similar fluidities.

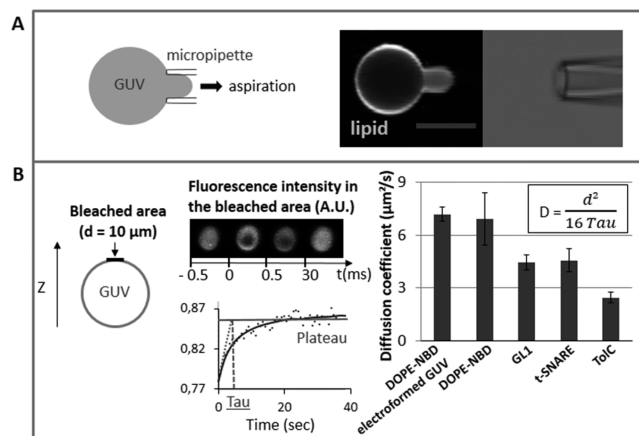


Figure 5. Micromanipulation and FRAP of the proteo-GUVs. (A) A micromanipulated GUV is aspirated with a micropipette. The fluorescent lipid is DOPE-ATTO647. The scale bar equals 10 μ m. (B) Photobleaching is performed at the top of the GUV over a 10- μ m-diameter area (left panel). Middle panel: graph and picture of the fluorescence recovery after bleaching, in which tau is the recovery time. Right panel: diffusion coefficients (D) of fluorescent lipid DOPE-NBD (statistics on 5 FRAP measurements on electroformed GUVs and GUVs prepared with the osmotic shock method), GL1 (statistics on 23 FRAP measurements), t-SNARE (statistics on 5 FRAP measurements), and TolC (statistics on 5 FRAP measurements) calculated from the tau and the diameter of the bleached area (d). The error bars in the graphs represent the standard deviation from the mean measured using multiple GUVs.

The diffusion coefficients of the proteins were also measured to check that they were well incorporated in the membrane. The diffusion coefficients were $4.5 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the lipid-anchored GL1 protein, $4.6 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the single transmembrane protein t-SNARE, and $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the trimeric protein TolC (Figure 5 B). TolC and t-SNARE diffuse slower than a lipid because of their trans-membrane domains. The difference between both proteins is expected because of the larger trans-membrane domain of TolC. Although GL1 is lipid-anchored, it is less mobile than a lipid possibly because of additional interactions with the membrane.

DISCUSSION

In the upcoming paragraphs, we are going to discuss the role of the osmotic shock in GUV formation, the conditions for efficient GUV growth, and how to use the GUVs for micromanipulation.

Mechanism of GUV Growth: Osmotic Shock and Drying Steps. Liposomes are first formed in a saline buffer and then dried on a glass coverslip under atmospheric pressure. The choice of the drying conditions could be questioned considering that vacuum is the usual way to dry lipids or liposomes. We tested it on liposomes and proteo-liposomes to form GUVs and proteo-GUVs. Vacuum drying of the small liposome for several hours (or overnight) led to a reasonable number of GUVs, but no proteo-GUVs were growing in contrast to drying at atmospheric pressure. We assume that slow drying under atmospheric pressure avoids the complete destruction of the membrane and the bilayer remains almost intact, trapping salt inside the liposomes. Our finding of partially drying the sample and thereby protecting the protein has been suggested before.²³

The initial osmolarity of solution to be dried is around 350 mOsm corresponding to an osmotic pressure of $\Delta P = 10^6$ Pa at room temperature. Hence adding water to 400 nm liposomes induces a surface tension of $\gamma = (r\Delta P)/2 = 0.1$ N/m, largely above the lysis tension of 10^{-2} N/m.^{13,42} Therefore, hydration with water triggers an osmotic shock that breaks the cohesion of the membrane at a certain point. We assume that this is the reason that the membrane immediately merges with other nearby pieces of bilayers and reseals to produce larger liposomes. When the liposomes are dried a second time, their large structure is preserved like it is during the first drying step. Therefore, during the second hydration the liposomes grow from larger liposomes than in the first cycle and become even larger. After the first cycle the osmolarity inside the liposomes is reduced three to five times depending on the rehydration volume, so the surface tension decreases but stays higher than the lysis tension. Several drying/hydration cycles can improve the GUV yield and quality, possibly through reorganization of the lipids during each cycle.

Lipid Concentration, Drop Size, Buffer Concentration, and Rehydration Volume. The lipid concentration, drop size, buffer concentration, and rehydration volume are crucial parameters that have to be adjusted to the respective experimental setup to obtain a large number of functional proteo-GUVs. Here, we discuss how the formation of the GUVs varies with function for these parameters.

Lipid concentrations in the range of 3–10 mM give a reasonable number of GUVs. For higher concentrations the layer of dried liposomes is too thick and the liposomes are trapped in the layer and form fewer GUVs. The size of the liposome drop to dry is another way to adjust the lipid concentration. Indeed, an increase in the volume of the liposome drop increases the density of liposomes in this area.

The buffer concentration and volume of water during the rehydration are two bound parameters. The volume of added water does not affect the growth but only the buffer dilution. The buffer of the small liposomes should be in the range of 100–300 mM, enough to get an osmotic shock. For 500 mM NaCl we could not see any GUVs forming in contrast to other published protocols. Those two parameters should be adjusted as a function of each other. The buffer concentration should be close to physiological conditions to support the reconstituted proteins. If a large final volume is needed but still with a high ionic concentration, for the micromanipulation experiment, for instance, we recommend to carry out the last hydration with a small volume of around 10 μ L and afterward carefully add more buffer with the correct dilution. In this last step caution is needed because when the diluted buffer is added it triggers a flow inside the drop that partially detaches the GUVs from the coverslip. To limit this effect, the additional buffer can be added in the form of a ring around the initial drop, which are simultaneously merging together (Figure S6), leading to an increase in the initial drop with limited impact on the GUVs.

We assume that the buffer composition inside the GUV closely matches the one outside. The GUVs appear to be completely spherical, meaning that they are under tension and their osmolarity is larger than for the outer solution. However, a change of more than 30 mOsm (i.e., 10% of a physiological outer medium) would not allow the formation of the largest GUVs we observe (up to 100 μ m).

Protein Addition: GUV Growth and Sucrose. The addition of proteins in the protocol clearly reduces the amount and size of GUVs. Those observations could be explained in

different ways. The incorporated protein may increase the lysis tension of the membrane,⁴³ which would reduce the breaking of the membrane. It could also affect the viscosity of the membrane and prevent the reformation of the membrane after the osmotic shock.

To protect the protein during GUV growth, the addition of sucrose in the micromolar range has been recommended.¹⁷ Sucrose stabilizes proteins via hydrogen bonding during the drying process.^{17,44} Additionally, it also stabilizes the membrane during the drying process by being a substitute for the missing water molecules. In this way the gap between the lipid headgroups remains filled, preventing its transition to the rigid gel phase during the drying process.¹⁷ A concentration that is too high generates a layer of sucrose above the liposomes and proteo-liposomes, inhibiting GUV formation. The additional sucrose does not interfere with the process of proteo-GUV formation. Here, sucrose was used in the case of the t-SNARE and TolC reconstitution, which are known to denature easily.

Using our method it is not possible to control the orientation of the incorporated protein. This is a standard issue, and there has been an elegant way recently proposed to make asymmetric GUVs using transmembrane proteins in detergent.¹⁶ We tried this method on TolC. It worked but the density of incorporated proteins was low (at least 10 times less than the osmotic shock method). This method was not suitable for GL1 because it has to be lipidated on small liposomes. We did not try it on t-SNARE.

■ CONCLUSIONS AND SUMMARY

In this article we show a new way to form proteo-GUVs. The method is based on the generation of an osmotic shock when hydrating a lipid film made of dried small liposomes. We have successfully inserted three different kinds of proteins: a membrane-associated protein (GL1), a membrane protein with one helical transmembrane domain (t-SNARE), and a channel protein (TolC). We have explored the most favorable conditions. In all cases an initial lipid concentration of 3 mM and a salt concentration of between 100 to 300 mM have given the highest yield of GUVs. Furthermore, several consecutive drying and hydration cycles can improve the amount and size of the GUVs.

We verified the unilamellarity of the GUVs as well as the amount of protein incorporated. Additionally, we were able to demonstrate that the reconstituted proteins retain their physiological functionality and are mobile in the membrane of the GUVs.

As an application, we show that the GUVs can be micromanipulated.

To conclude, our results show that by using our newly developed method different kinds of proteins can be integrated and retain their natural function and diffusive behavior.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Study of the growth parameter for the GUV-formation process. Characteristics of a drying liposome film with high and low sucrose contents. Calibration curves for the estimation of protein reconstituted into the GUVs. A picture of the control, protein-free GUVs incubated with CDV for the functionality test of the t-SNAREs in the GUVs. Measurement of the unilamellarity of the produced GUVs with and without protein. Demonstration of how additional buffer can be added without disturbing the growth of the GUVs. The Supporting

Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01173.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: pincet@lps.ens.fr.

Author Contributions

[†](I.M. and A.G.) These authors contributed equally to the work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Partner University Funds exchange grant between the Yale and Ecole Normale Supérieure Laboratories, by the FRM FDT20140931036 grant and by the ANR-13-BSV5-0004 grant. We thank Prof. T. Melia for many helpful discussions, Dr. D. Taresté and N. Rodriguez for their comments on the manuscript, and Dr. L. Monlezun, Dr. M. Picard, and A. Verchère for purifying the TolC protein.

REFERENCES

- (1) Chan, Y. H.; Boxer, S. G. Model membrane systems and their applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 581–587.
- (2) Angelova, M.; Dimitrov, D. S. A mechanism of liposome electroformation. *Faraday Discuss., Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303–311.
- (3) Pott, T.; Bouvrais, H.; Meleard, P. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *154*, 115–119.
- (4) Montes, L. R.; Alonso, A.; Goni, F. M.; Bagatolli, L. A. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3548–3554.
- (5) Estes, D. J.; Mayer, M. Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1712*, 152–160.
- (6) Reeves, J. P.; Dowben, R. M. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.* **1969**, *73*, 49–60.
- (7) Akashi, K.; Miyata, H.; Itoh, H.; Kinoshita, K., Jr. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3242–3250.
- (8) Horger, K. S.; Estes, D. J.; Capone, R.; Mayer, M. Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1810–1819.
- (9) Weinberger, A.; Tsai, F. C.; Koenderink, G. H.; Schmidt, T. F.; Itri, R.; Meier, W.; Schmatko, T.; Schroder, A.; Marques, C. Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **2013**, *105*, 154–164.
- (10) C, B.; Jeffries, G. D. M.; Orwar, O.; Jesorka, A. Formation of giant unilamellar vesicles from spin-coated lipid films by localized IR heating. *Soft Matter* **2012**, *8*, 10823–10826.
- (11) Buboltz, J. T.; Feigenson, G. W. A novel strategy for the preparation of liposomes: rapid solvent exchange. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1417*, 232–245.
- (12) Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D. T.; Modi, B. P.; Zare, R. N. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 11443–11447.
- (13) Abkarian, M.; Loiseau, E.; Massiera, G. Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design. *Soft Matter* **2011**, *7*, 4610–4614.
- (14) Pautot, S.; Frisken, B. J.; Weitz, D. A. Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir* **2003**, *19*, 2870–2879.
- (15) Aimon, S.; Manzi, J.; Schmidt, D.; Poveda Larrosa, J. A.; Bassereau, P.; Toombes, G. E. Functional reconstitution of a voltage-

gated potassium channel in giant unilamellar vesicles. *PLoS One* **2011**, *6*, e25529.

(16) Dezi, M.; Di Cicco, A.; Bassereau, P.; Levy, D. Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 7276–7281.

(17) Doeven, M. K.; Folgering, J. H.; Krasnikov, V.; Geertsma, E. R.; van den Bogaart, G.; Poolman, B. Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1134–1142.

(18) Kahya, N.; Pecher, E. I.; de Boeij, W. P.; Wiersma, D. A.; Hoekstra, D. Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1464–1474.

(19) Liu, Y. J.; Hansen, G. P.; Venancio-Marques, A.; Baigl, D. Cell-free preparation of functional and triggerable giant proteoliposomes. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2243–2247.

(20) Meleard, P.; Bagatolli, L. A.; Pott, T. Giant unilamellar vesicle electroformation from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions. *Methods Enzymol.* **2009**, *465*, 161–176.

(21) Varnier, A.; Kermarrec, F.; Blesneac, I.; Moreau, C.; Liguori, L.; Lenormand, J. L.; Piccollet-D'hahan, N. A simple method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *J. Membr. Biol.* **2010**, *233*, 85–92.

(22) Horger, K. S.; Liu, H.; Rao, D. K.; Shukla, S.; Sept, D.; Ambudkar, S. V.; Mayer, M. Hydrogel-assisted functional reconstitution of human P-glycoprotein (ABCB1) in giant liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 643–653.

(23) Girard, P.; Pecreaux, J.; Lenoir, G.; Falson, P.; Rigaud, J. L.; Bassereau, P. A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 419–429.

(24) Shaklee, P. M.; Semrau, S.; Malkus, M.; Kubick, S.; Dogterom, M.; Schmidt, T. Protein incorporation in giant lipid vesicles under physiological conditions. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 175–179.

(25) Merkle, D.; Kahya, N.; Schwill, P. Reconstitution and anchoring of cytoskeleton inside giant unilamellar vesicles. *Chem-BioChem* **2008**, *9*, 2673–2681.

(26) Osawa, M.; Anderson, D. E.; Erickson, H. P. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* **2008**, *320*, 792–794.

(27) Nath, S.; Dancourt, J.; Shteyn, V.; Puente, G.; Fong, W. M.; Nag, S.; Bewersdorf, J.; Yamamoto, A.; Antonny, B.; Melia, T. J. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 415–424.

(28) Parlati, F.; Weber, T.; McNew, J. A.; Westermann, B.; Sollner, T. H.; Rothman, J. E. Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 12565–12570.

(29) Li, F.; Kummel, D.; Coleman, J.; Reinisch, K. M.; Rothman, J. E.; Pincet, F. A half-zipped SNARE complex represents a functional intermediate in membrane fusion. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3456–3464.

(30) Li, F.; Pincet, F.; Perez, E.; Giraudo, C. G.; Taresté, D.; Rothman, J. E. Complexin activates and clamps SNAREpins by a common mechanism involving an intermediate energetic state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 941–946.

(31) Kummel, D.; Krishnakumar, S. S.; Radoff, D. T.; Li, F.; Giraudo, C. G.; Pincet, F.; Rothman, J. E.; Reinisch, K. M. Complexin cross-links prefusion SNAREs into a zigzag array. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 927–933.

(32) Li, F.; Pincet, F.; Perez, E.; Eng, W. S.; Melia, T. J.; Rothman, J. E.; Taresté, D. Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 890–896.

(33) Broutin, I.; Benabdelhak, H.; Moreel, X.; Lascombe, M. B.; Lerouge, D.; Ducruix, A. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the outer membrane efflux proteins OprM and OprN from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr., Sect. F* **2005**, *61*, 315–318.

- (34) Scott, B. L.; Van Komen, J. S.; Liu, S.; Weber, T.; Melia, T. J.; McNew, J. A. Liposome fusion assay to monitor intracellular membrane fusion machines. *Methods Enzymol.* **2003**, *372*, 274–300.
- (35) Angelova, M. I.; Soleau, S.; Meleard, P.; Faucon, J. F.; Bothorel, P. Preparation of Giant Vesicles by External Ac Electric-Fields - Kinetics and Applications. *Prog. Colloids Polym. Sci.* **1992**, *89*, 127–131.
- (36) Weber, T.; Zemelman, B. V.; McNew, J. A.; Westermann, B.; Gmachl, M.; Parlati, F.; Sollner, T. H.; Rothman, J. E. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **1998**, *92*, 759–772.
- (37) Koronakis, V.; Sharff, A.; Koronakis, E.; Luisi, B.; Hughes, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **2000**, *405*, 914–919.
- (38) Galush, W. J.; Nye, J. A.; Groves, J. T. Quantitative fluorescence microscopy using supported lipid bilayer standards. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2512–2519.
- (39) Choy, A.; Dancourt, J.; Mugo, B.; O'Connor, T. J.; Isberg, R. R.; Melia, T. J.; Roy, C. R. The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* **2012**, *338*, 1072–1076.
- (40) Tareste, D.; Shen, J.; Melia, T. J.; Rothman, J. E. SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 2380–2385.
- (41) Malsam, J.; Parisotto, D.; Bharat, T. A.; Scheutzw, A.; Krause, J. M.; Briggs, J. A.; Sollner, T. H. Complexin arrests a pool of docked vesicles for fast Ca²⁺-dependent release. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3270–3281.
- (42) Portet, T.; Dimova, R. A new method for measuring edge tensions and stability of lipid bilayers: effect of membrane composition. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3264–3273.
- (43) Kim, D. H.; Frangos, J. A. Effects of amyloid beta-peptides on the lysis tension of lipid bilayer vesicles containing oxysterols. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 620–628.
- (44) Crowe, J. H.; Crowe, L. M.; Carpenter, J. F.; Rudolph, A. S.; Wistrom, C. A.; Spargo, B. J.; Anchordoguy, T. J. Interactions of sugars with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *947*, 367–384.